

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Flávia Nogueira de Sá

Defesas de larvas de *Plagiometriona flavescens* e *Stolas areolata* (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) contra predadores. O papel do escudo de fezes e de compostos químicos.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas
(Ecologia).

Orientação: Prof. Dr. José Roberto Trigo

2004

Dedico esta tese ao Emerson e aos meus pais.

**Gente tão importante para mim
e que nunca me deixou faltar carinho e entusiasmo.**

À curiosidade do meu avô Luís...

Agradecimentos

Ao Trigo, meu orientador e que acabou se tornando um amigo. Fico feliz ao reconhecer o quanto cresci graças aos tantos puxões de orelha e discussões, mesmo se muitas vezes elas não fizessem muito sentido. Agradeço também por ter confiado em mim, deixado os besouros entrarem no seu laboratório e entender minha vida de viajante.

Ao Emerson por viver os altos e baixos do trabalho comigo, conseguido estar presente absolutamente em todos os momentos, mesmo morando tão longe. Obrigada por sempre ter um tempinho pra visitar e ser visitado, falar no telefone. Sem seu o carinho, calma, interesse, incentivo, idéias e entusiasmo por ser ecólogo tudo seria tão difícil...

Aos meus pais desde os inúmeros passeios no Zoológico quando era pequena, pela torcida e compreensão pela minha ausência. Obrigada por acreditar em mim e participar da vida de doutorado comigo. Estiveram prontos pra ajudar sempre, encontrando soluções e ouvindo pedidos de “socorro” - mesmo quando este era salvar um carro detonado no meio do mato!

Ao Bio, meu irmão, Cissa, minha prima, pelo carinho, interesse no meu trabalho e incentivo - cada um do seu jeito!

Aos doutores André Vítor Freitas, Jarbas Queiroz, João Vasconcellos, Renato Pereira e Vera Solferini pela leitura cuidadosa e sugestões neste trabalho.

Aos amigos tão queridos de Campinas. Adalberto, Adrianinha, Arlindo, Horácio, Humberto, Karina, Marcelo, Marcinha, Sônia e tantos outros que não dá para citar aqui, mas que foram essenciais para me divertir, discutir ciência e ajudar em qualquer coisa que precisasse a qualquer hora. Vou ficar com muuuuuuuita saudade...

Aos amigos de sempre e família pela torcida e força à distância: Amy, Verônica, Lumy, vovó, tio Bruno e “cia.”, tia Uca, tio Ivan e todos os outros tios, D. Aparecida e S. Pedro, Eneida e Vítor, Liana e Andy, Adriana, Laura, Marcus, e a galera da UFRJ.

Aos professores do Departamento de Zoologia, IB, Unicamp, que influenciaram tão positivamente na minha formação e, de uma forma ou de outra, tiveram um papel importante neste trabalho: Benson, Cláudia, Eleonore, Flavião, João Vasconcellos, Paulinho, Thomas e Wesley.

À galera de ontem e de hoje do Laboratório de Ecologia Química, Augusto, Alexandra, Breila, Karina, Luciana, Marcela, Márcio Zikán, Miúdo, Nice, Paiva, Vivi e

tantos agregados, que ajudaram a fazer do “lab” um lugar mais divertido de trabalho. Os “bailes Funk” serão inesquecíveis!

Aos funcionários do departamento de Zoologia, Ricardinho, Sinval, Sueli, Eliana que sempre tiveram boa vontade para ajudar.

Ao Fredric Vencl, que no seu jeito peculiar de ser me mostrou vários aspectos interessantes dos escudos e me deixou participar do seu trabalho, enriquecendo tanto as minhas idéias e esta tese.

Ao Dr. Lech Borowiec e Jolanta Ćewiê tojańska pela identificação dos Chrysomelidae e Adalberto Santos pela identificação das aranhas.

Aos que me ajudaram a ilustrar este trabalho com fotografias, agradeço pela boa vontade de fotografar essas criaturas lindas, mas tão pequenas, ou de ceder suas fotos.

Ao Flávio da granja “Fazenda Aves do Paraíso” por conceder os pintinhos sempre tão simpaticamente.

À Margarete e Lenice pela força e por torcer por mim sempre.

Ao pessoal do Parque Intervales. Todo mundo mesmo, desde diretor à recepcionista, monitores, meninas da limpeza, que estavam sempre prontos e animados para colaborar. Se não fosse a ajuda de todos ainda não teria terminado este trabalho! Aos pesquisadores, principalmente os “veadólogos”, pela companhia muito divertida!

Ao Sr. Lauro, D. Zaíra, Ronaldo e os guardas na Serra do Japi, que sempre me receberam com tanto carinho e interesse nas coletas de besouros.

Ao pessoal da UFRGS , principalmente prof. Gilson Moreira, Solange e Elisete, que me adotaram na fase de redação deste trabalho e me mantiveram ligada na “Ecologia além tese”.

A FAPESP pela concessão da bolsa e reserva técnica, processo número 99/10154-6.



Índice

Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Tabelas	xi
Índice de Figuras	xii
Introdução Geral	1
Capítulo 1. O papel do escudo de fezes como defesa contra predadores em larvas de <i>Plagiometriona flavescens</i> e <i>Stolas areolata</i> (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae)	
Introdução	18
Materiais e Métodos	23
Resultados.....	38
Discussão.....	44
Capítulo 2. Estratégias de defesas de larvas de <i>Stolas areolata</i> e <i>Plagiometriona</i> <i>flavescens</i> (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae) através de substâncias químicas	
Introdução	76
Materiais e Métodos	86
Resultados.....	92
Discussão.....	94
Considerações finais	106
Referências bibliográficas	110

RESUMO

Besouros da família Chrysomelidae apresentam uma grande diversidade de inimigos naturais e uma grande variedade de estratégias de defesa contra estes. Neste trabalho, estudamos larvas de duas espécies de Cassidinae (subfamília de Chrysomelidae), *Plagiometriona flavescens* e *Stolas areolata*, com o objetivo principal de entender se as mesmas se protegem contra predadores utilizando escudos de fezes e/ou outros tipos de defesas. Realizamos experimentos de curta duração de campo e laboratório para testar a proteção dos escudos, comparando a mortalidade de larvas de ambas as espécies com o escudo mantido, removido, ou substituído por um escudo artificial, feito com fezes da larva da mariposa noctuídea *Spodoptera frugiperda*. Experimentos de campo mostraram que larvas de ambas as espécies com o escudo natural mantido tiveram a sobrevivência significativamente maior do que larvas sem escudo ou com escudo artificial, demonstrando que esta estrutura não as protege fisicamente. Esses resultados sugeriram que a proteção dos escudos poderia ser de natureza química. Oferecendo larvas para dois modelos de predadores, a formiga *Camponotus crassus* e a ave *Gallus gallus*, em bioensaios em laboratório, não obtivemos para *P. flavescens* padrões semelhantes aos obtidos no campo. Confirmamos a proteção química dos escudos de *P. flavescens* ao verificarmos em experimentos de campo e de laboratório que iscas tratadas com extratos de escudo foram rejeitadas. Larvas de *S. areolata* foram pouco predadas por ambos os predadores no laboratório, independentemente do tratamento. Em experimentos de longa duração, no campo e em laboratório, observamos que a manutenção dos escudos de *P. flavescens* não representa um custo para o desempenho e nem para a sobrevivência das larvas. Portanto, pode-se concluir que o escudo é um tipo de defesa desta espécie por serem impalatáveis e poucos custosos para a larva. Para *S. areolata*, em experimentos de longa duração no laboratório, verificamos que seus escudos provocam um aumento significativo na mortalidade, apesar de não representarem nenhum custo para o seu desempenho. No experimento semelhante, realizado no campo, não encontramos diferença significativa na mortalidade de larvas com ou sem o escudo. Neste caso, sugerimos que o escudo possa apresentar outra função, que não a proteção contra predadores. No segundo capítulo da tese testamos a eficiência de outras estratégias de defesa química das larvas estudadas. Verificamos que *P. flavescens* protegem-se de predadores quimicamente orientados através

da camuflagem química, já que hidrocarbonetos cuticulares das larvas e de folhas de sua planta hospedeira apresentam 78% de similaridade. Devido a esta estratégia, observamos em experimentos de laboratório que formigas *C. crassus* não são capazes de encontrar as larvas. Larvas de *S. areolata* se protegem através de substâncias apolares presentes nos seus corpos. Verificamos em experimentos de laboratório que iscas tratadas com extratos apolares de larvas são rejeitadas por *G. gallus*. Não verificamos o mesmo tipo de reação em predadores no campo, mas é possível que as substâncias apolares do corpo das larvas sejam potencialmente uma estratégia de defesa de *S. areolata*. Este trabalho demonstra que duas espécies de uma mesma sub-família podem se proteger de maneiras distintas dos seus predadores.

ABSTRACT

Chrysomelidae beetles have a great diversity of natural enemies and also present many different defensive strategies. In this work we have studied two Cassidinae species (a Chrysomelidae subfamily), *Plagiometriona flavescens* and *Stolas areolata*, with the main objective to understand if these species can protect themselves against predators using their fecal shields or chemical substances. We have carried out short-term experiments in the field and in the laboratory to test shield protection by comparing the mortality of larvae of both species with their fecal shield maintained, removed or substituted by an artificial shield, without unpalatable chemical substances. Field experiment revealed that larvae of both species experimented with their natural shield survived more frequently than larvae without shield or with artificial shield, thus suggesting the chemical nature of the defense. In laboratory experiments we have offered larvae to ants *Camponotus crassus* and to chicks, *Gallus gallus*. We have obtained for *P. flavescens* similar patterns of those obtained in the field, but with non-significant differences. We have confirmed the chemical protection provided by its shield because of the high rejection rates of baits treated with shield extract both in the field and laboratory bioassays. Both predators preyed upon few *S. areolata* larvae, independently of the treatment they were submitted. In long-term experiments in the field and in the laboratory using *P. flavescens* larvae, we have observed that the maintenance of the shields did not represent any cost in the performance and survivorship of the larvae. Therefore, shields represent a defense for being unpalatable and cheap for larvae. Long-term experiments in the laboratory, using *S. areolata* larvae, showed the presence of the shield increases larval mortality, although no difference in the performance of larvae with and without shield was detected. In a similar experiment conducted in the field we did not detect any significant difference in the mortality of larvae with or without shields. In this case, we concluded that this structure may have a different function than protecting larvae against predators. In the second chapter, We have tested the efficiency of other strategies of chemical defense. We have observed that *P. flavescens* larvae protect themselves against chemically oriented predators by the chemical camouflage. Cuticular hydrocarbons of larvae are 78% similar to the hydrocarbons of its host plant; thus *C. crassus* ants were not able to find *P. flavescens*. Larvae of *S. areolata* protect themselves by apolar compounds, which are present in their body. We have

observed in laboratory bioassays that baits treated with the apolar extract of larvae are rejected by *G. gallus*. We did not observe the same type of predator behavior in a field experiment. However, it is possible that such apolar substances could be potentially defensive to *S. areolata* larvae. Finally, this work shows that two different species belonging to the same sub-family can protect themselves against predators so differently.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Características de escudos e larvas de Cassidinae pertencentes a diferentes tribos, com ocorrência no Brasil (de acordo com Buzzi 1988 e Lenice Medeiros, comunicação pessoal).....	55
Tabela 2.1 Resultados da análise em cromatografia gasosa-espectrometria de hidrocarbonetos cuticulares de folhas de <i>Aureliana fasciculata</i> e de larvas de quinto estadio de <i>Plagiometriona flavescens</i>	102

ÍNDICE DE FIGURAS

<p>Figura 1. Espécies estudadas. A. <i>Stolas areolata</i> na fase larval. B. <i>Stolas areolata</i> na fase adulta. C. <i>Plagiometriona flavescens</i> na fase larval. D. <i>Plagiometriona flavescens</i> na fase adulta. As setas indicam os escudos de fezes. Escalas em todas as figuras representam 0,5cm. Fotos de Ricardo Sawaya e Marcelo Gonzaga.....</p>	17
<p>Figura 1.1. Aspecto do escudo de fezes de diferentes espécies de Cassidinae (Chrysomelidae). A. Vistas posterior e ventral, respectivamente, do escudo de <i>Stolas</i> sp. O escudo é formado por uma estrutura côncava onde a larva se insere completamente (desenho: Ângela Midori). B. Larva de <i>Gratiana spadicea</i> com escudo em forma de concha que cobre todo o corpo da larva (foto: Lenice Medeiros). C. Larva de Cassidinae não identificado com escudo formado por fezes filiformes (foto: Uwe Schulz). D. Larva de <i>Stolas areolata</i> e o escudo formado por uma massa de fezes e exúvia (desenho: Ângela Midori). E. Larva de <i>Cistudinella</i> sp. com o escudo formado só por exúvias (foto: Lenice Medeiros). F. Larva de <i>Deloyala guttata</i> com o escudo formado só por exúvias (desenho em Olmstead & Denno 1992).....</p>	57

Figura 1.2. Aspecto de larvas e plantas submetidas a um experimento para se testar o papel de escudos em larvas de Cassidinae. A. Planta hospedeira sem proteção contra inimigos naturais colocada em trilha no campo (foto: José Roberto Trigo). B. Planta hospedeira com proteção contra inimigos naturais colocada em trilha no campo (note que os vasos são colocados dentro da mesma armação usada para proteger as plantas) (foto: José Roberto Trigo). C. Larva de *S. areolata* com o escudo natural (foto: Ricardo Sawaya). D. Larva de *S. areolata* com o escudo removido (foto: Ricardo Sawaya). E. Larva de *S. areolata* com o escudo natural substituído por um escudo artificial (foto: Ricardo Sawaya). 58

Figura 1.3. Desaparecimento de larvas de *Plagiometriona flavescens* e *Stolas areolata* submetidas a diferentes tratamentos no campo. Comparações foram feitas entre cada uma das espécies. Tamanho amostral para *Plagiometriona flavescens*: 30 para cada tratamento e para *Stolas areolata* 20. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%..... 59

Figura 1.4. Padrão de ocorrência diurno e noturno de eventos de predação em *Stolas areolata* e *Plagiometriona flavescens* submetidos a experimentos de campo. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Comparações foram feitas entre cada uma das espécies. Letras diferentes indicam diferença significativa no nível de 5%..... 60

Figura 1.5. Predação em larvas de *Plagiometriona flavescens* oferecidas a ninhos da formiga *Camponotus crassus* durante bioensaios em laboratório. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras indicam a ausência de diferença significativa entre os tratamentos (nível 5%)..... 61

- Figura 1.6. Predação em larvas de *Stolas areolata* oferecidas a ninhos da formiga *Camponotus crassus* durante bioensaios em laboratório. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras indicam a ausência de diferença significativa entre os tratamentos (nível 5%)..... 62
- Figura 1.7. Predação em larvas de *Plagiometriona flavescens* oferecidas *Gallus gallus* jovens em bioensaios em laboratório. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras indicam a ausência de diferença significativa entre os tratamentos (nível 5%)..... 63
- Figura 1.8. Predação em larvas de *Stolas areolata* oferecidas *Gallus gallus* jovens em bioensaios em laboratório. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras indicam a ausência de diferença significativa entre os tratamentos (nível 5%)..... 64
- Figura 1.9. Percentagem de desaparecimento de larvas de *Spodoptera frugiperda* usadas como presas e submetidas a diferentes tratamentos no campo. Tamanho amostral: 30 para cada tratamento. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%..... 65
- Figura 1.10. Percentagens de predação pela formiga *Camponotus crassus* em larvas de *Spodoptera frugiperda* usadas como presas e submetidas a diferentes tratamentos. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%..... 66
- Figura 1.11. Percentagem de predação por *Gallus gallus* em larvas de *Spodoptera frugiperda* usadas como presas e submetidas a diferentes tratamentos no laboratório. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%..... 67

- Figura 1.12. Curvas de sobrevivência de larvas de *Plagiometriona flavescens* acompanhadas no campo. Larvas foram mantidas com escudos intactos ou removidos e colocadas em plantas protegidas ou sem proteção contra inimigos naturais. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%..... 68
- Figura 1.13. Curvas de sobrevivência de larvas de *Plagiometriona flavescens* acompanhadas no laboratório. Larvas foram criadas com escudos intactos ou removidos. Letras indicam ausência de diferença significativa (nível 5%)..... 69
- Figura 1.14. Desempenho de larvas de *Plagiometriona flavescens* submetidas a um experimento de laboratório para testar a influência da presença do escudo de fezes. Larvas foram acompanhadas com e sem o escudo e os parâmetros avaliados foram: A. tempo de desenvolvimento larval, B. tempo de desenvolvimento de pupa, C. peso de pupa, D. peso de adulto, E. taxa de consumo relativo, e F. taxa de crescimento relativo. 1 – escudo intacto, 2 - escudo removido. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%..... 70
- Figura 1.15. Regressão linear entre a taxa de consumo relativo e a taxa de crescimento relativo de larvas de quinto estadio de *Plagiometriona flavescens* com e sem escudos..... 71
- Figura 1.16. Curvas de sobrevivência de larvas de *Stolas areolata* acompanhadas no campo. Larvas foram mantidas com escudos intactos ou removidos e colocadas em plantas protegidas ou sem proteção contra inimigos naturais. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%..... 72
- Figura 1.17. Curvas de sobrevivência de larvas de *Stolas areolata* acompanhadas no laboratório. Larvas foram criadas com escudos intactos ou removidos. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%..... 73

- Figura 1.18. Desempenho de larvas de *Stolas areolata* submetidas a um experimento de laboratório para testar a influência da presença do escudo de fezes. Larvas foram acompanhadas com e sem o escudo e os parâmetros avaliados foram: A. tempo de desenvolvimento larval, B. tempo de desenvolvimento de pupa, C. peso de pupa, D. peso de adulto, E. taxa de consumo relativo, e F. taxa de crescimento relativo. 1 – escudo intacto, 2 - escudo removido. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%..... 74
- Figura 1.19. Regressão linear a taxa de consumo relativo e a taxa de crescimento reativo de larvas de quinto estadio de *Stolas areolata* com e sem escudos..... 75
- Figura 2.1. Desaparecimento de larvas de *S. frugiperda* usadas para aplicação de extratos de larvas de *S. areolata* e seus controles. *S. frugiperda* foram submetidas a um experimento de campo para testar a proteção química de larvas de *S. areolata* devido a substâncias químicas presentes no seu corpo. Tamanho amostral para todos os tratamentos = 20. Letras diferentes indicam diferença no nível de 5%..... 103
- Figura 2.2. Taxas de consumo de larvas de *S. frugiperda* usadas como vetores destes compostos químicos encontrados no corpo de larvas de *S. areolata*, apresentados na forma de extratos orgânico e aquoso da larva do besouro. Taxas obtidas em um bioensaio no laboratório usando *G. gallus* para testar se compostos químicos encontrados no corpo de larvas de *S. areolata* poderiam protegê-las. 104
- Figura 2.3. Índices de recrutamento da formiga *Camponotus crassus* em larvas de *Spodoptera frugiperda* pintadas com extratos de hidrocarbonetos cuticulares de folhas de *Aureliana fasciculata*. Tratamentos: 1 - controle, 10 - hidrocarbonetos 10 vezes concentrados e 5- hidrocarbonetos 5 vezes concentrados. Letras diferentes indicam diferença no nível de 5% 105

INTRODUÇÃO GERAL

Em todas as comunidades existem interações entre os organismos nas quais cada animal se alimenta de uma ou várias espécies de animais ou plantas e também pode ser consumido por outros predadores e parasitas (Edmunds 1974). Por isso, é esperado que exista competição entre predadores por presas, levando-os a desenvolverem estratégias especializadas e eficientes para capturar determinadas espécies de presas (Edmunds 1974). Da mesma forma, como todos os organismos são potencialmente alimento para outros, foram desenvolvidos diversos tipos de defesa, física, química, morfológica ou comportamental, para evitar que sejam atacados ou predados (Edmunds 1974; Begon *et al.* 1990). Portanto, qualquer característica que reduza as chances de sucesso do ataque por um outro animal, parasitas ou predadores, pode ser considerado mecanismo defensivo (Edmunds 1974). Considerando-se que em uma seqüência completa de predação, uma presa deve ser detectada, atacada, capturada, subjugada e consumida pelo predador (Chai 1990), as defesas devem aumentar a sobrevivência de presas interrompendo o processo de predação em qualquer um desses estágios (Begon *et al.* 1990). Camuflagem, aposematismo, anacorese e mimetismo são exemplos de mecanismos primários de defesa, que operam antes do predador e/ou parasita iniciar o ataque; esconder, voar, apresentar comportamento de ameaça ao inimigo, tanatose, direcionar o ataque a uma parte não vulnerável, ou retaliar utilizando diferentes armas como espinhos, quelas, peças bucais ou substâncias químicas impalatáveis ou tóxicas, são exemplos de mecanismos secundários de defesa, que operam de forma a aumentar as chances de um indivíduo sobreviver ao encontro com o predador e/ou parasita (Edmunds 1974; Begon *et al.* 1990).

Portanto, mecanismos anti-predação devem existir em todos os organismos. Insetos fitófagos, entre eles os besouros da família Chrysomelidae, podem ser considerados presas expostas ao encontro com seus inimigos naturais por diversos fatores. A relativa baixa conversão do alimento em energia faz com que os insetos fitófagos gastem muito tempo para alimentação (Pasteels *et al.* 1988b; Schoonhoven *et al.* 1998) e por isso podem ser facilmente localizados e capturados (Pasteels *et al.* 1988b). Esta facilidade é reforçada pelo fato da maioria das espécies dessa família ter o hábito da ectofagia, sendo encontrados sobre folhas em todos os estágios de desenvolvimento (Olmstead 1996). Pasteels & Rowell-Rahier (1991) também sugerem que o fato dos Chrysomelidae serem em sua maioria oligófagos, terem alta fecundidade e se alimentarem em plantas com distribuição agregada, permite que predadores utilizem, para encontrá-los, pistas da sua planta hospedeira, além das pistas da própria presa.

Considerando-se as informações descritas acima, pode-se entender a riqueza de inimigos naturais de Chrysomelidae. Estes são representados por organismos de diferentes grupos taxonômicos, variando desde patógenos intracelulares, como bactéria e vírus, parasitas, como helmintos nematódeos, vespas e moscas parasitóides até predadores maiores como aves e lagartos (Olmstead 1996; Jolivet & Verma 2002; Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto 2003a).

Na sub-família Cassidinae, na qual pertencem as espécies investigadas neste trabalho, o padrão não é diferente. Em uma revisão sobre inimigos naturais de Cassidinae, Olmstead (1996) menciona que, entre Chrysomelidae, esta sub-família é uma das que apresentam parasitismo mais frequentemente; e que inimigos naturais podem provocar grandes impactos em populações. Nogueira-de-Sá *et al.* (no prelo) e Olmstead (1996) revisaram os registros de inimigos naturais de Cassidinae na literatura e verificaram que:

1. Os principais inimigos no estágio de ovo são formigas predadoras e himenópteros parasitóides.
2. Os principais predadores de larvas e pupas são aranhas, hemípteros e formigas. Estas últimas, apesar de serem representadas por poucas espécies, têm grandes impactos em populações de cassidíneos na região tropical. Os principais parasitóides de larvas e pupas são Eulophidae e Chalcididae (Hymenoptera) e Tachinidae (Diptera).
3. Aves são predadores de adultos, apesar de não haverem muitos registros de inimigos naturais de cassidíneos neste estágio de desenvolvimento. Também existem registros ocasionais de parasitismo por Tachinidae (Diptera) e parasitismo por nematódeos nesse estágio de desenvolvimento.

Tabelas de vida e estudos populacionais de várias espécies de Cassidinae, indicam que a maior parte da mortalidade provocada por inimigos naturais ocorre nos estágios imaturos. Aproximadamente 65% das interações entre Cassidinae e inimigos naturais envolvem larvas e pupas, 25% envolvem ovos, enquanto que existem poucos registros para adultos (Olmstead, 1996). Segundo esse autor, a baixa incidência de ataques a adultos pode ser explicada pelo fato dos mesmos serem bem protegidos contra inimigos. Entretanto, nenhum trabalho deixa claro se existe relação entre os poucos registros de ataques a adultos e a proteção dos mesmos contra inimigos.

A riqueza de inimigos naturais é considerada por alguns autores como uma pressão seletiva importante que resultou na grande variedade de estratégias de defesa dentro de Chrysomelidae; as quais podem ser de natureza física, comportamental, morfológica ou química (Pasteels *et al* 1984; Pasteels *et al.* 1988b; Olmstead 1996; Vencl *et al.* 1999; Jolivet & Verma 2002; Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto 2003a). Segundo Vencl &

Morton (1999), defesas químicas têm recebido a maior parte da atenção nos últimos anos. Entretanto, como este tipo de defesa será discutido mais extensamente nos capítulos à seguir, nesta parte do trabalho eu citarei exemplos que ilustram outros tipos de defesa de Chrysomelidae:

1. Cuidado parental. Esta estratégia é bastante rara entre os Chrysomelidae, sendo registrada apenas em 22 espécies, pertencentes a oito gêneros das sub-famílias Chrysomelinae e Cassidinae (Chaboo 2002). No caso da segunda sub-família, todos os casos conhecidos até o momento ocorrem na região Neotropical (Windsor 1987; Windsor & Choe 1994; Jolivet & Verma 2002). Em todos os exemplos conhecidos, o cuidado é exercido somente pela fêmea (Windsor & Choe 1994; Chaboo 2002; Frieiro-Costa & Vasconcellos-Neto 2003) e os casos em que machos foram observados perto de desovas são raros e a função destes não foi investigada (Windsor & Choe 1994; Windsor *et al.* 1992; Jolivet & Verma 2002). Entretanto, o tempo em que a prole é cuidada se diferencia entre Cassidinae e Chrysomelinae; o primeiro grupo guarda a prole até o fim da fase de pupa (Buzzi 1988; Windsor & Choe 1994), enquanto que no segundo grupo o cuidado se restringe a fase larval (Windsor & Choe 1994). Todas as espécies de Cassidinae que apresentam este comportamento utilizam lianas, principalmente das famílias Convolvulaceae e Asteraceae, como plantas hospedeiras, têm desovas numerosas e as larvas são altamente gregárias (Windsor & Choe 1994; Chaboo 2002; Frieiro-Costa & Vasconcellos-Neto 2003). Segundo Windsor *et al.* (1992) esta estratégia somente é observada em espécies médias e grandes (maiores que 7,5mm.). As fêmeas ficam sobre a prole, não se alimentando durante o período de guarda (Buzzi 1988; Windsor & Choe 1994; Frieiro-Costa & Vasconcellos-Neto 2003) e defendendo as larvas fisicamente contra predadores (Kudo & Ishibashi 1995; Chaboo 2002; Jolivet & Verma 2002).

2. Gregarismo de larvas. A origem do gregarismo em larvas, geralmente, é a oviposição agrupada (Grégoire 1988; Jolivet & Verma 2002). O gregarismo tem como função principal a defesa de larvas. Segundo Grégoire (1988), a defesa pode ocorrer pela redução da probabilidade de que uma larva individualmente seja atacada quanto maior for o tamanho do grupo em que se encontra. Além disso, no caso de larvas que apresentam substâncias impalatáveis/tóxicas, o efeito aditivo destas em um agregado, pode se tornar mais óbvio (Grégoire 1988; Blum 1994; Olmstead 1996). Além da função de defesa, a agregação pode facilitar a alimentação de larvas recém-emergidas dos ovos, já que em algumas espécies essas não são capazes de perfurar a cutícula da folha (Grégoire 1988). Pode haver também agregações de adultos que ocorrem quando os mesmos apresentam atividade reduzida e procuram um local com micro-clima favorável (Flowers 1991; Jolivet & Verma 2002). Algumas espécies de Chrysomelidae apresentam agregações poli-específicas (Grégoire 1988; Jolivet & Verma 2002). A intensidade do gregarismo pode variar dependendo da espécie (Grégoire 1988). Podem ser encontradas desde agregações representadas por larvas se alimentando na mesma folha e com contatos ocasionais, até grupos de larvas muito próximas e permanentemente unidas, apresentando um comportamento de agregação (Grégoire 1988). Este segundo e mais compacto tipo de gregarismo pode ser também chamado de cicloalexia, como será explicado no próximo item.
3. Cicloalexia. A cicloalexia é definida como um anel de defesa de larvas de insetos, tanto durante o dia como durante a noite (Vasconcellos-Neto & Jolivet 1994). Quando estão nesta posição, as larvas formam um círculo, permanecendo fortemente unidas com suas cabeças ou extremidades do abdômen virados para a periferia. Algumas larvas permanecem no centro do círculo (Vasconcellos-Neto & Jolivet 1994). Geralmente ocorrem trocas de posições no círculo (Vasconcellos-Neto & Jolivet 1994). Larvas nesta posição apresentam movimentos coordenados (Vasconcellos-Neto & Jolivet 1994; Jolivet & Verma 2002), podendo apresentar comportamentos ameaçadores, regurgitarem e

morderem para repelirem predadores e parasitóides (Vasconcellos-Neto & Jolivet 1994; Jolivet & Verma 2002). Por esta razão, Vasconcellos-Neto & Jolivet (1994) mencionaram que a eficiência da cicloalexia em proteger larvas contra inimigos naturais é aumentada se larvas apresentam defesas químicas. Entre os Chrysomelidae, este fenômeno também já foi observado nas sub-famílias Chrysomelinae e Galerucinae (Vasconcellos-Neto & Jolivet 1994), e algumas vezes é associado ao cuidado parental (Vasconcellos-Neto & Jolivet 1994; Jolivet & Verma 2002). Assim como o gregarismo, a cicloalexia também se origina de ovos agrupados e, após 24h. da emergência dos ovos, as larvas já formam o padrão de agregação em círculo (Chattopadhyay & Sukul 1994). Em *Aspidomorpha miliaris* (Cassidinae) o tamanho dos grupos varia amplamente e larvas provenientes de uma mesma desova podem se arranjar em um ou dois círculos (Chattopadhyay & Sukul 1994). Este comportamento nem sempre é mantido até que se atinja a fase de pupa, e larvas de algumas espécies como os cassidíneos *Aspidomorpha miliaris* e *Conchyloctenia punctata* se dispersam nos últimos ínstares de desenvolvimento (Chattopadhyay & Sukul 1994; Heron 1999). Segundo Jolivet & Verma (2002) feromônios devem estar envolvidos na agregação de larvas em cicloalexia. Entretanto, como Vasconcellos-Neto & Jolivet (1994) mencionaram casos de círculos poli-específicos, deve haver outro mecanismo para unir as larvas e coordenar seus movimentos.

4. Tanatose. A ocorrência do comportamento de tanatose é variável mesmo dentro de um grupo (Jolivet & Verma 2002). Esta ocorre em diferentes espécies de diferentes grupos. Segundo Windsor *et al.* (1992) este comportamento é mais freqüente entre espécies maiores (> 11mm.). Apesar dos muitos exemplos sobre adultos (Olmstead 1996), para larvas existe o exemplo do cassidíneo *Cistudinella* sp. alimentando-se em *Cordia trichotoma* (Boraginaceae) (Lenice Medeiros, com. pess.).

5. Voo. Voar quando houver perturbação é um comportamento comum em espécies menores de Cassidinae (4-7mm.), enquanto que as espécies maiores raramente utilizam esta estratégia (Windsor *et al.* 1992).
6. Saltos. Espécies com habilidade de saltar podem se beneficiar de um eficiente modo de locomoção (Furth 1988), além de se tornarem presas difíceis de serem capturadas (Begossi & Benson 1988; Furth 1988). No entanto, esta estratégia é observada somente em membros da sub-família Alticinae.
7. Estridulação. O comportamento de produzir som pela fricção de estruturas modificadas e/ou superfície é observado em Cassidinae e também em besouros das subfamílias Hispinae, Clytrinae, Criocerinae, Zeugophorinae, Megalopodinae e Palophaginae (Schmitt 1994). Três tipos de sistemas estridulatórios já foram descritos, sendo formados basicamente por estruturas cuticulares (Schmitt 1994). Segundo Schmitt (1994) e Jolivet & Verma (2002) o sistema estridulatório das espécies de Chrysomelidae apresentam a função de perturbar predadores através do som e por isso pode ser considerado um mecanismo de defesa.
8. Mimetismo. Devido ao fato de muitos Chrysomelidae serem quimicamente defendidos (Pasteels *et al.* 1988a,b), tanto larvas como adultos participam de anéis miméticos e são modelos para muitos mímicos batesianos (Balsbaugh-Jr. 1988). Estes complexos de espécies não são formados necessariamente só por Chrysomelidae, mas incluem muitos outros taxa, como besouros de outras famílias ou insetos de outras ordens (Balsbaugh-Jr. 1988). Del-Claro (1991) descreveu o mimetismo entre o alticíneo *Homophoeta octoguttata* (modelo) e o cerambicídeo *Adesmus colligathus* (o mímico). Vasconcellos-Neto (1988) distinguiu oito diferentes morfotipos de *Chelymorpha cribraria* (Cassidinae) ocorrendo em simpatria e que provavelmente faziam parte de um anel mimético, junto com espécies de Coccinellidae (Coleoptera). Também podem ser encontrados exemplos de mimetismo wasmaniano em que parasitas tornam-se semelhantes ao hospedeiro como forma de

facilitar a associação e são exemplificados pelo Clytrinae *Hockingia curiosa* e pelo Cryptocephalinae *Isnus petasus* (Jolivet & Verma 2002).

9. Coloração. Apesar do papel da coloração de Chrysomelidae não ter sido testado até o momento, existem, em algumas espécies, evidências de que a coloração pode estar associada à proteção contra inimigos naturais (Olmstead 1996; Jolivet & Verma 2002). Muitos exemplos podem ser encontrados na natureza em que larvas pertencentes a diversas sub-famílias (entre elas, Cassidinae) apresentam coloração críptica ou se cobrem com produtos do ambiente ou das mesmas como forma de se camuflarem (Balsbaugh 1988; Olmstead 1996; Jolivet & Verma 2002) ou têm coloração aposemática (Olmstead 1996). Adultos de Cassidinae podem ser confundidos com folhas, fezes de aves, galhas e até mesmo o céu (quando olhado por baixo) (Windsor *et al.* 1992; Olmstead 1996). Adultos dourados podem ser protegidos por parecerem gotas de chuva ao serem observados sob o sol ou refletirem a imagem do ambiente, camuflando-se (Windsor *et al.* 1992; Jolivet 1994). Diversas espécies de Cassidinae apresentam a volta do élitro transparente, deixando parecer o substrato e confundindo o inimigo (Jolivet 1994). Algumas espécies de Chrysomelinae, Alticinae e principalmente Cassidinae também podem mudar de cor (Buzzi 1988; Jolivet 1994; Jolivet & Verma 2002), tornando-se mais crípticas ou mais conspícuas, dependendo da situação. Estas mudanças podem acontecer rapidamente, como o caso de *Aspidomorpha* (Cassidinae) que muda de dourado para vermelho em 2-3 minutos (Jolivet 1994), ou podem ocorrer com a mudança da estação ou idade (Jolivet & Verma 2002). Outras espécies ainda podem apresentar coloração conspícua durante toda a sua vida (Windsor *et al.* 1992; Olmstead 1996).
10. Alimentação escondida. Para estarem fora da visão dos predadores e parasitas, larvas de muitas espécies de Chrysomelidae podem forragear em horário diferente ao da atividade dos inimigos, podem se alimentar em partes protegidas da planta hospedeira, ou as escavá-las e consumir suas partes internas (Jolivet & Verma 2002). Exemplos relacionados a esta

estratégia são os de larvas da sub-família Sagrinae, que podem formar galhas (Jolivet & Verma 2002), e larvas de algumas espécies de Alticinae, Galerucinae, Hispinae e Zeugophorinae que são minadoras (Jolivet & Verma 2002). Seifert & Seifert (1979) também investigaram cinco diferentes gêneros de Hispinae que se alimentam da superfície interna de folhas jovens de *Heliconia* (Musaceae), que permanecem enroladas. Algumas espécies de Alticinae, Galerucinae, Eumolpinae e Synetinae se alimentam de raízes (Jolivet & Verma 2002). Existem ainda exemplos de Cassidinae que não se alimentam escondidos, mas que utilizam refúgios no solo. Neste caso as larvas são capazes de se mover rapidamente entre os sítios de alimentação na planta hospedeira e o refúgio (Windsor *et al.* 1992). Frieiro-Costa & Vasconcellos-Neto (2003) observaram que durante a noite, larvas de *Omaspides tricolorata* saem da posição de cicloalexia e se movem para sítios de alimentação, voltando à posição de defesa no crepúsculo matinal.

11. Outras características morfológicas. Blum (1994) sugeriu que a grande diversidade de formas do corpo de larvas de Chrysomelidae, variando de achatadas a sub-cilíndricas, podem ter significância no confronto com predadores. A forma do corpo de Cassidinae é freqüentemente mencionada como defensiva (Windsor *et al.* 1992; Olmstead 1996; Jolivet & Verma 2002). Cassidinae adultos são capazes de retrain os seus apêndices por baixo do élitro e pronoto quando perturbados, justificando serem chamados de besouros tartaruga (tortoise beetles) (Olmstead 1996). Élitros e pronoto são fortemente encaixados, formando uma carapaça única (Windsor *et al.* 1992), e são altamente esclerotizados, tornando-os bastante rígidos (Jolivet & Verma 2002). Em muitas espécies, as margens dos élitros e pronoto são achatadas, cobrindo além do corpo e cabeça do besouro (Olmstead 1996; Jolivet & Verma 2002). Adultos de Cassidinae também possuem tarsos que se aderem fortemente ao substrato, tornando-os difíceis de serem removidos (Windsor *et al.* 1992; Attygalle *et al.* 2000). Em cada tarso podem ser encontrados 60.000 cerdas responsáveis pela adesão ao substrato (Attygalle *et al.* 2000; Jolivet & Verma 2002). Quando o adulto

está se locomovendo normalmente, apenas uma pequena parte das cerdas contatam a superfície (Attygale *et al.* 2000; Jolivet & Verma 2002). Entretanto quando perturbados, ocorre a secreção de alcanos e alcenos do tarso que facilitam o contato de todas as cerdas com a superfície (Attygale *et al.* 2000; Jolivet & Verma 2002), tornando-os firmemente aderidos à superfície da folha (Jolivet & Verma 2002).

Conforme mencionado anteriormente, larvas e adultos ainda podem se defender quimicamente, utilizando diversas estratégias e diferentes compostos químicos. Este tipo de defesa corresponde à abordagem principal deste trabalho.

Esta tese foi planejada com o objetivo inicial de testar somente a eficiência do escudo de fezes como estratégia de defesa de larvas de duas espécies de Cassidinae, *Plagiometriona flavescens* e *Stolas areolata*. Entretanto, ao realizar os experimentos propostos no projeto inicial fizemos duas observações importantes sobre cada uma das espécies:

1. Ao oferecer larvas de *P. flavescens* para colônias de formigas *Camponotus crassus*, observamos que estas não reconheciam as mesmas como presas. As formigas caminhavam sobre as larvas e não tentavam atacá-las. Este mesmo comportamento de formigas já havia sido observado por Portugal (2001) quando estas estavam em contato com larvas da borboleta ithomínea *Mechanitis polymnia*. Este autor verificou que formigas não notavam a presença das larvas porque estas se camuflavam quimicamente em folhas de sua planta hospedeira. Essa camuflagem ocorria porque o padrão de hidrocarbonetos cuticulares de *M. polymnia* era similar ao da sua planta hospedeira. Considerando estes fatos, incluímos novos experimentos ao trabalho para verificar se o comportamento de formigas perante *P. flavescens* também se explicava pela camuflagem química das larvas.
2. Ao realizar bioensaios oferecendo larvas de *S. areolata* para formigas *C. crassus* e *Gallus gallus*, verificamos que as larvas eram rejeitadas pelos predadores independentemente da presença ou ausência dos escudos. Considerando esta indicação, levantamos a hipótese de

que larvas se protegeriam por substâncias químicas presentes no corpo e não nos escudos. Para testá-la, incluímos novos experimentos para verificar o papel de substâncias presentes no corpo de larvas em protegê-las contra predadores.

Portanto o objetivo dessa tese foi estudar como duas espécies de Cassidinae, *P. flavescens* e *S. areolata*, se protegem contra predadores utilizando diferentes estratégias. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram abordados:

1. Verificar o papel do escudo de fezes na proteção das larvas contra predadores, determinando as taxas de sobrevivência de larvas com e sem escudo e estimar a influência de predadores sobre as mesmas no campo.
2. Se larvas que tiverem seu escudo mantido apresentarem maior sobrevivência em comparação com larvas sem o escudo, determinar se a natureza da proteção pelo escudo de fezes é física ou química.
3. Verificar se a presença e manutenção do escudo de fezes representam algum custo no desenvolvimento e desempenho de larvas.
4. Se o escudo de fezes não tiver o papel de aumentar a sobrevivência das larvas, verificar se as mesmas apresentam outra estratégia de defesa..

ESPÉCIES ESTUDADAS***Stolas areolata*** (Germar, 1824) (Figuras 1A,B)

Esta espécie pertence à tribo Stolaini e foi registrada somente utilizando *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. (Asteraceae) (Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto 2003b). Segundo Borowiec & Swietojanska (2003), esta espécie já foi registrada em localidades no Sul e Sudeste do Brasil e na Argentina. Os ovos são colocados agrupados (tamanho médio da desova é de 6 ovos), seu desenvolvimento desde fase de ovo até a fase adulta leva em média 29 dias, sendo aproximadamente 14 dias para a fase larval (Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto 2003b). Larvas desta espécie apresentam escudo de fezes que não cobre toda a extensão do corpo. Aspectos da interação de *S. areolata* com sua planta hospedeira e inimigos naturais já foram investigados por Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto (2003a,b), ressaltando como prováveis estratégias de larvas contra predação e parasitismo a freqüente localização na superfície inferior das folhas da planta hospedeira, o hábito gregário em instares iniciais de desenvolvimento e a capacidade de regurgitar ao ser perturbada. Segundo Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto (2003a), predação e parasitismo são importantes causadores de mortalidade de ovos e larvas desta espécie. Larvas são predadas por hemípteros e aranhas e parasitadas por uma espécie de Tachinidae (Diptera) (Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto 2003a). Esses autores encontraram oito espécies de himenópteros parasitóides de ovos. Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto (2003a) também verificaram que ocorre uma sincronia na flutuação da abundância de predadores potenciais e besouros ao longo do ano, sugerindo uma pressão provocada pelos inimigos naturais.

Plagiometriona flavescens (Boheman 1855) (Figuras 1C,D)

Esta espécie pertence à tribo Cassidini e foi registrada utilizando *Acnistus spinosus* U.D., *Acnistus arborecens* (L.) Schecht., *Aureliana fasciculata* (Vellozo) Sendt. e *Solanum sisymbriifolium* Lam., todas da família Solanaceae, como plantas hospedeiras (Buzzi 1988 e 1994; Nogueira-de-Sá & Macêdo 1998; Borowiec & Swietojanska 2003). Segundo revisões de Buzzi (1988; 1994), esta família de planta é a mais freqüente entre as hospedeiras de várias espécies do gênero *Plagiometriona*. Na área de estudo, observamos esta espécie consumindo somente *Aureliana fasciculata*. De acordo com Buzzi (1988) e Borowiec & Swietojanska (2003), esta espécie já foi registrada em diversas localidades no Brasil, no Paraguai e na Argentina.

Ovos de *P. flavescens* são colocados isoladamente, e da mesma forma permanecem as larvas durante toda essa fase (Nogueira-de-Sá & Macêdo 1999). Seu desenvolvimento desde a fase de ovo até a fase adulta leva em média 36 dias, sendo aproximadamente 24 dias para a fase larval (Nogueira-de-Sá & Macêdo 1999). Larvas desta espécie apresentam escudo de fezes que cobre quase toda a extensão do corpo. Alguns aspectos de sua biologia, interação com inimigos naturais e preferência alimentar foram investigados por Nogueira-de-Sá & Macêdo (1998;1999), destacando-se a influência de hemípteros predadores, himenópteros parasitóides de ovos e pupas, e de um Tachinidae (Diptera) parasitóide de larvas. Entre as estratégias contra predação e parasitismo de larvas, além da presença do escudo de fezes, ressalta-se a localização freqüente de larvas, em ínstares iniciais de desenvolvimento, na superfície inferior de folhas (Nogueira-de-Sá & Macêdo 1999).

ÁREA DE ESTUDO

Os experimentos de campo deste trabalho foram realizados no Parque Estadual Intervales ($24^{\circ}12'S$ a $24^{\circ}25'S$ e $48^{\circ}03'O$ a $48^{\circ}30'O$), localizado em território de cinco municípios do Estado de São Paulo: Ribeirão Grande, Guapiara, Iporanga, Eldorado Paulista e Sete Barras, totalizando 49.888 ha. de área. Abrange parte da Serra de Paranapiacaba, com altitudes variando entre 60 a 1100 m, e está inserido entre os vales do rio Paranapanema e do rio Ribeira do Iguape (Fundação Florestal 1997).

Grande parte do seu território está localizada na zona intertropical e por isso o clima é do tipo Af. - tropical chuvoso de floresta, segundo a classificação de Köppen. A média anual de precipitação e de temperatura na região do Parque onde foi realizado este trabalho varia entre 1500 e 2000 mm. e 20 a 22°C, respectivamente (Fundação Florestal 1997).

O Parque Intervales apresenta como vegetação predominante a Mata Atlântica. Na porção norte do Parque, no planalto Guapiara, a vegetação recebe uma maior contribuição de espécies da floresta estacional semidecidual (Fundação Florestal 1997). Contribuem para a diversidade da fisionomia da vegetação do Parque vários fatores como o relevo, o embasamento das rochas granito-gnaiss-migmatíticas, os solos predominantemente ácidos e rasos, e o clima quente e úmido (Fundação Florestal 1997).

Para que as populações das espécies estudadas não fossem alteradas na área onde foram realizados os experimentos (e conseqüentemente seus inimigos naturais também), coletamos adultos das espécies estudadas na Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo ($23^{\circ}11'S/46^{\circ}52'O$), no limite sul da zona tropical. Esta serra (700 – 1300 m. de altitude) é formada por um maciço que se estende de sudoeste para nordeste (Pinto 1992). A Serra do

Japi ocupa uma posição geográfica muito peculiar no estado de São Paulo, estando situada em uma região de interface entre duas fisionomias de vegetação distintas: a Mata Atlântica e as florestas mesófilas semidecíduas do planalto (Leitão-Filho 1992).

Dentro do Parque Intervales selecionamos a trilha do Lago Negro para a realização dos experimentos. Esta trilha foi escolhida porque estavam presentes as plantas hospedeiras de ambas as espécies de Cassidinae, *Aureliana fasciculata* e *Calea pinnatifida*, e as populações dos besouros na área eram aparentemente pequenas. Além disso, experimentos prévios, com massas de modelar como modelos de presas, indicaram que nessa trilha havia uma das mais altas taxas de predação na área de estudo.

Os experimentos de campo foram realizados durante quatro verões consecutivos, entre março e abril/2000 e entre novembro e abril dos verões subseqüentes, encerrando-se em abril 2003. Os experimentos foram realizados durante esses meses porque esta é a época em que larvas e seus potenciais predadores são mais abundantes (Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto 2003a).

CRIAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS EM LABORATÓRIO

Tanto nos experimentos de campo, como nos de laboratório, utilizamos larvas que eram provenientes da criação mantida no Laboratório de Ecologia Química, Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, UNICAMP. Coletamos adultos de *S. areolata* e *P. flavescens* na Serra do Japi e os mantivemos em laboratório para a obtenção de ovos e, posteriormente, larvas. As condições das câmaras de criação foram 12:12 L:E, 25°C, UR não totalmente controlada (\pm 50-60%). Folhas oferecidas para alimentação das larvas também foram provenientes de plantas hospedeiras trazidas da Serra do Japi e plantadas

em vasos de 50 litros, na casa de vegetação do Laboratório de Ecologia Química. Adotamos este procedimento para que pudéssemos nos certificar da origem das larvas, e não utilizar larvas doentes ou parasitadas nos experimentos.

MANUTENÇÃO DAS PLANTAS HOSPEDEIRAS

As plantas utilizadas em todos os experimentos desta tese foram obtidas através de mudas coletadas na Serra do Japi e cultivadas individualmente em vasos plásticos na casa de vegetação do Laboratório de Ecologia Química. Estas mesmas plantas foram utilizadas nos experimentos de campo. Na ocasião dos experimentos, estas foram levadas para o campo e colocadas ao longo da trilha com o espaçamento de 10 metros entre cada vaso. Desta forma, pudemos padronizar nas plantas utilizadas o tamanho, aproximadamente um metro de altura, e arquitetura, com quatro ramos aproximadamente. Adotamos este procedimento para evitar que inimigos naturais que utilizassem pistas provenientes da planta hospedeira encontrassem seus hospedeiros (no caso as larvas estudadas). Além disso, optamos pela utilização de besouros e plantas provenientes de uma outra área de floresta atlântica para que não fosse alterada a oferta de recursos para os predadores desses animais bem como a disponibilidade de plantas hospedeiras para os insetos.

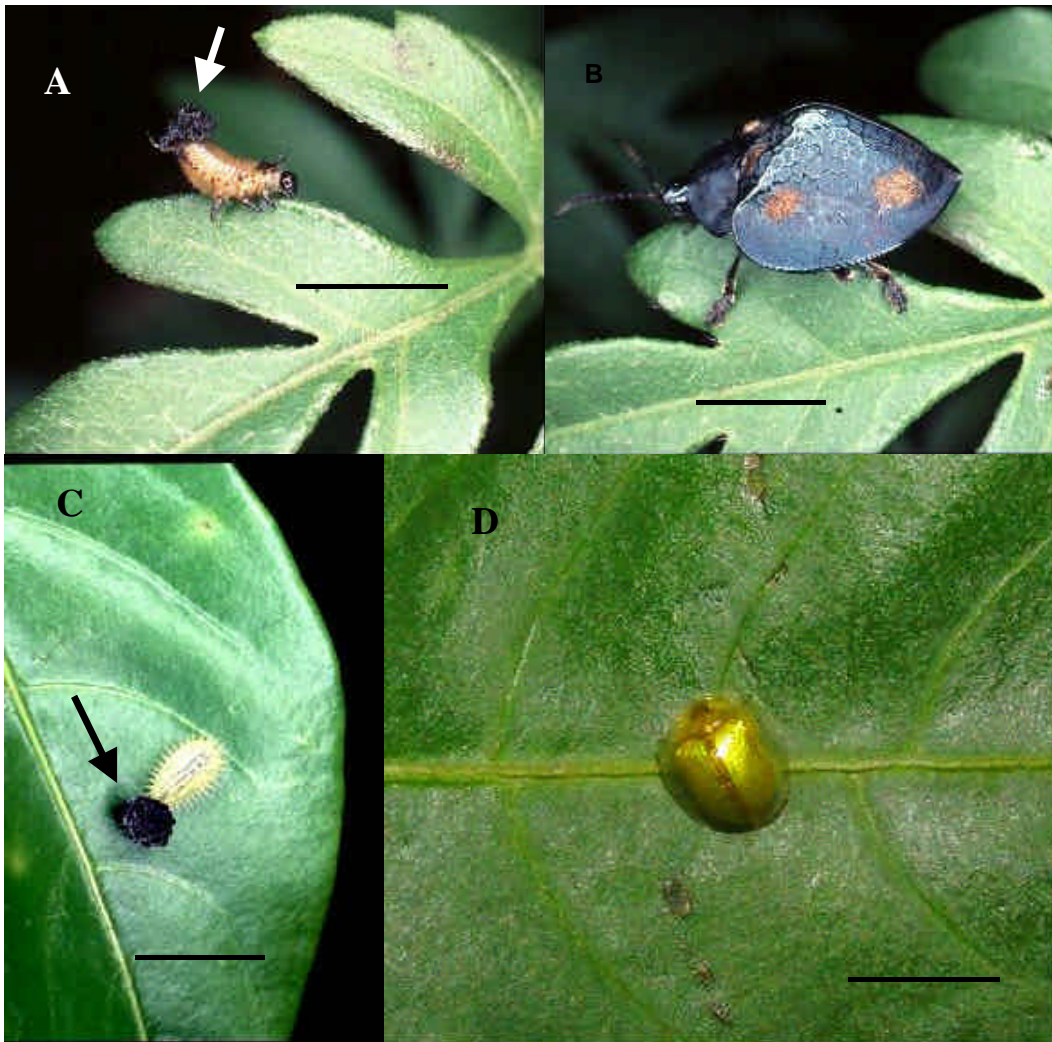


Figura 1. Espécies estudadas. **A.** *Stolas areolata* na fase larval. **B.** *Stolas areolata* na fase adulta. **C.** *Plagiometriona flavescens* na fase larval. **D.** *Plagiometriona flavescens* na fase adulta. As setas indicam os escudos de fezes. Escalas (linha preta) em todas as figuras representam 0,5 cm. Fotos de Ricardo Janini Sawaya e Marcelo Oliveira Gonzaga.

CAPÍTULO 1

O papel do escudo de fezes como defesa contra predadores em larvas de *Plagiometriona flavescens* e *Stolas areolata* (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae)

INTRODUÇÃO

Entre as diversas estratégias de defesa de besouros da família Chrysomelidae em diferentes estágios de desenvolvimento podem ser citadas a utilização de produtos de descarte, como fezes, exúvias e compostos químicos (Olmstead 1994; Olmstead 1996). Ao defecarem em ovos, fêmeas de Chrysomelidae das subfamílias Chrysomelinae, Galerucinae, Alticinae, Hispinae e Cassidinae, protegem-nos contra predadores e parasitóides através de camuflagem, barreira física ou repelência química (Damman & Cappuccino 1991; Hilker 1992; Olmstead 1994). Pupas de alguns Cassidinae mantêm o escudo de fezes, sugerindo que esse possa conferir proteção nesse estágio de desenvolvimento (Olmstead 1994; Müller & Hilker 2003). Muitos adultos defecam em reflexo a perturbação, sugerindo também uma forma de defesa (Olmstead 1994).

As larvas de Alticinae, Criocerinae e Cassidinae carregam massas de material fecal e/ou exúvia acumuladas sobre o seu abdomen. No caso de Cassidinae, esse material é carregado por uma estrutura em forma de garfo localizada no oitavo segmento abdominal, chamada de furca, formando assim um escudo (Windsor *et al.* 1992; Vencl *et al.* 1999; Eisner & Eisner 2000). Essa massa é mais comumente chamada de escudo de fezes, mas também são usados os termos vestimenta larval, apêndice fecal, máscara fecal, almofada fecal e anexo-exúvio fecal (referências em Gómez *et al.* 1999). O acúmulo de fezes e secreções ocorre devido a retração do nono e décimo segmentos do abdômen e pela

presença de um reto alongado, capaz de se protrair, prolongando-se até a parte externa da larva (Windsor *et al.* 1992; Vencl *et al.* 1999). Em algumas espécies, a cada muda, a exúvia é acoplada à furca, se unindo às fezes que se acumulam ao longo do desenvolvimento larval. Esses escudos são bastante manobráveis devido à capacidade de rotação da furca (Eisner *et al.* 1967; Eisner & Eisner 2000). A movimentação do escudo ocorre quando os escolos, as cerdas de função sensorial localizadas ao redor do corpo da larva, são estimuladas e portanto o escudo é direcionado ao ponto de estímulo (Olmstead 1996). Portanto, quando esta estrutura não cobre completamente a larva, ela pode ser levada em qualquer direção cobrindo áreas do corpo da larva, quando tocadas por predadores ou parasitóides (Olmstead 1994; Eisner & Eisner 2000). Muitas vezes, as fezes úmidas ou fios de fezes são acoplados ao escudo de uma maneira simétrica (por exemplo, veja descrição em Eisner & Eisner 2000), o que justifica os diferentes aspectos do escudo. Existe uma grande variação no tamanho (cobrindo ou não todo o corpo da larva) (Buzzi 1988; Olmstead & Denno 1993; Olmstead 1994; Olmstead 1996), forma (espiral, leque ou simplesmente uma massa redonda) (Windsor *et al.* 1992; Eisner & Eisner 2000), consistência (rígidos ou pastosos) (Eisner & Eisner 2000; Müller & Hilker 2003) e composição química (Müller & Hilker 2003); alguns escudos podem ser constituídos só de exúvias (Müller & Hilker 1999; Müller & Hilker 2003) (Figura 1.1). A forma do corpo e o tamanho da furca também variam amplamente entre diferentes espécies (Tabela 1.1), e não se sabe se a variação morfológica dos escudos pode estar relacionados a estes.

Apesar do escudo de fezes interessar pesquisadores há vários anos, a função desses não havia sido demonstrada até trabalhos recentes que indicaram seu papel na proteção contra diversos tipos de pressões abióticas e bióticas. Funções como proteção contra insolação (veja referências em Müller & Hilker 2003), proteção contra predadores e

parasitóides (Eisner *et al.* 1967; Root & Messina 1983; Olmstead & Denno 1993; Olmstead 1994; Olmstead 1996; Morton & Vencel 1998; Vencel & Morton 1998; Gómez *et al.* 1999; Vencel & Morton 1999; Vencel *et al.* 1999; Evans *et al.* 2000; Muller 2002) e camuflagem (Olmstead 1994; Olmstead 1996) já foram também atribuídas para o escudo. As duas primeiras foram mais freqüentemente mencionadas nos trabalhos pioneiros sobre a descrição das larvas de Cassidinae (veja referências em Müller & Hilker 2003). Entretanto, em tais estudos, não foram realizados experimentos para testar sua eficácia na proteção contra insolação e camuflagem.

O primeiro estudo experimental para se verificar a função dos escudos de fezes foi realizado por Eisner *et al.* (1967). Neste trabalho, os autores observaram que larvas de *Cassida rubiginosa* (Cassidinae) eram mais freqüentemente predadas por formigas quando seu escudo era removido. Posteriormente experimentos realizados para testar o papel dos escudos confirmaram sua função defensiva (Olmstead & Denno 1993; Olmstead 1994; Morton & Vencel 1998; Gómez *et al.* 1999; Vencel & Morton 1999; Vencel *et al.* 1999; Muller 2002). Entretanto, Olmstead & Denno (1993) e Vencel & Morton (1998) sugeriram que essa estratégia de defesa não é totalmente eficiente, demonstrando que escudos protegem larvas contra predadores mandibulados (mandíbulas livres), que não são capazes de acessar a larva; mas predadores que apresentam peças bucais modificadas (por exemplo, rostro) são capazes de fazer com que essas estruturas atravessem o escudo e alcancem a larva. O mesmo ocorre com os ovipositores dos parasitóides (Schaffner e Müller 2001). Eisner & Eisner (2000) encontraram resultados opostos em bioensaios de laboratório: hemípteros (*Stiretrus* sp.) não foram capazes de preda larvas do cassidíneo *Hemisphaerota cyanea* que tinham seus escudos mantidos, enquanto que um predador mandibulado (o carabídeo *Calleida* sp.) consumiram as mesmas larvas. Olmstead & Denno (1993)

verificaram que além do tipo do aparelho bucal, seu comprimento também influenciava na capacidade de atacar e preda larvas com escudo. Em bioensaios em laboratório, esses autores demonstraram que os predadores que tinham mandíbulas ou rostros mais longos predaram um maior número de larvas (Olmstead & Denno 1993). Olmstead & Denno (1993), observando o ataque por parte de vespas, e Eisner & Eisner (2000), pelo besouro carábido *Calleida* sp., verificaram que predadores mandibulados, que são capazes de preda larvas com escudos, apresentam um comportamento diferenciado ao consumir a presa. Vespas não seriam influenciadas pela presença do escudo porque, ao atacar, estas seguram as larvas com o primeiro par de pernas, viram as larvas e as atacam pelo seu lado ventral (Olmstead & Denno 1993). Já o carábido morde parte do escudo pela sua lateral ou por cima até alcançar a larva e a consome completamente deixando o escudo e furca (Eisner & Eisner 2000).

Finalmente, Müller & Hilker (2003) fizeram uma revisão dos bioensaios realizados com diversas espécies de predadores e Chrysomelidae e demonstraram que um mesmo predador pode ser capaz de ignorar o escudo e consumir uma espécie de larva e não consumir outra espécie devido à presença do escudo. Portanto, esta informação indica que nem todos os escudos representam uma defesa completa contra qualquer tipo de predador. Morton & Vencel (1998), Vencel & Morton (1998), Vencel *et al.* (1999), Gómez *et al.* (1999) demonstraram que a proteção do escudo tem natureza química. Os compostos defensivos frequentemente têm origem nas plantas hospedeiras. Logo, larvas obtêm estas substâncias, algumas vezes as modificam, e as mantêm nas fezes para se defenderem contra inimigos naturais. Entretanto, autores como Root & Messina (1983), Eisner & Eisner (2000), Müller (2002), Müller & Hilker (2003) sugeriram que os escudos conferem proteção física para as larvas. Apesar de não terem testado, Müller & Hilker (2003) mencionaram que a

proteção física pode ocorrer em casos em que a larva consegue escapar do ataque dos predadores enquanto os mesmos estiverem manipulando os escudos.

Müller & Hilker (1999) e Schaffner & Müller (2001) verificaram que a repelência de inimigos naturais causada pelo escudo não é regra, e reações inesperadas podem ser encontradas. Müller & Hilker (1999) estudando três espécies de Cassidinae, observaram que escudos de fezes ou de exúvia, ou os voláteis liberados por estes, funcionam como pistas visuais ou olfativas para *Myrmica rubra* (Formicidae). Schaffner & Müller (2001) encontraram resultados semelhantes na interação de larvas de *Lilioceris lilli* (Criocerinae) com escudo de fezes e o parasitóide *Lemophagus pulcher* (Hymenoptera: Ichneumonidae), observando que os escudos e compostos químicos presentes nos mesmos tinham um papel no processo de localização e aceitação do hospedeiro pelo parasitóide. Pode-se considerar que a presença do escudo de fezes, nesses casos, representa um custo ecológico para a larva de Chrysomelidae: a facilitação do seu encontro com um inimigo natural.

Dicke & Sabelis (1992) chamam a atenção que além dos custos ecológicos associados a emissão de compostos químicos, os organismos emissores ainda se confrontam com custos energéticos em termos de produção, transporte, estocagem e liberação das substâncias. Considerando-se que, no caso dos escudos, não existe custo fisiológico para se produzir ou transportar os compostos defensivos, já que eles são provenientes da planta hospedeira e descartados nas fezes, as larvas podem ter o custo adicional da manutenção dos mesmos durante todo o período larval.

Os escudos de fezes são um sistema ideal para se avaliar os custos de defesa, porque estes podem ser removidos experimentalmente sem danificar a larva (Olmstead & Denno 1992; Olmstead 1994). Olmstead & Denno (1992) investigaram o custo da manutenção de escudos de fezes para três espécies de Cassidinae, *Charidotella bicolor*,

Deloyala guttata e *Chelymorpha cassidea*, e verificaram que o desempenho e desenvolvimento de larvas com ou sem escudos não apresentaram diferenças significativas, concluindo que esta estrutura não representa custo para as larvas.

Desta forma, tendo-se em vista as diferentes reações de inimigos naturais em relação ao escudo de fezes, esse trabalho teve como objetivo principal estudar o efeito desta estrutura na interação de *Stolas areolata* e *Plagiometriona flavescens* (ambos Cassidinae) com predadores. Os objetivos específicos foram verificar se o escudo de fezes tem uma função defensiva, e se a natureza dessa proteção era física ou química. Além disso foi verificar se a manutenção dos escudos representava algum custo para o desempenho e sobrevivência de larvas..

MATERIAIS E MÉTODOS

1. O papel do escudo de fezes. Experimentos de campo

Conduzimos um experimento em condições naturais para verificar se a presença do escudo é importante na proteção das larvas de *S. areolata* e *P. flavescens* contra predadores e se esta proteção é devido à barreira física representada por esta estrutura.

Este experimento foi realizado entre os anos 2000 e 2001, sempre durante os meses de pico das populações das espécies estudadas (dezembro-março, segundo Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto 2003a; Nogueira-de-Sá & Macêdo 1999).

Todas as larvas que utilizamos nos experimentos descritos a seguir foram provenientes de criação em laboratório sob condições descritas na introdução geral de tese. As plantas hospedeiras utilizadas no experimento também foram provenientes de cultivo na casa de vegetação do Laboratório de Ecologia Química.

Larvas de terceiro ou quarto instar vivas das duas espécies estudadas foram submetidas aos seis tratamentos descritos abaixo:

- i. Larvas com o escudo de fezes substituído por um escudo artificial construído de fezes de larvas *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dieta artificial, de acordo com Ferraz (1991), em plantas sem proteção (Figuras 1.2A e 1.2E).
- ii. Larvas com o escudo de fezes substituído por um escudo artificial (como descrito em i) em plantas com proteção. Protegemos as plantas colocando-as no centro de uma armação de madeira coberta com tela de malha fina (tecido tipo Voil), e Tanglefoot[®] aplicado na base do caule da planta, excluindo assim todos os potenciais predadores (Figura 1.2B).
- iii. Larvas com seu escudo removido completamente, em plantas sem proteção (Figura 1.2D).
- iv. Larvas com seu escudo removido completamente, em plantas com proteção como descrito em ii.
- v. Larvas com o escudo de fezes intacto, em plantas sem proteção (Figura 1.2C).
- vi. Larvas com o escudo de fezes intacto, em plantas com proteção como descrito em ii.

Neste experimento utilizamos 30 indivíduos de *A. fasciculata* e 20 de *C. pinnatifida*, os quais foram submetidos a cada um dos tratamentos em seis períodos experimentais de três dias cada. Cada planta individual foi submetida a um determinado tratamento apenas uma vez. Desta forma, no final de todos os seis períodos experimentais,

cada planta teria sido submetida a todos os tratamentos e com isso nós tínhamos 30 replicatas do experimento com *P. flavescens* e 20 replicatas com *S. areolata*. Os tratamentos para cada planta foram definidos através de sorteio. À partir do segundo período experimental, ao sortear o tratamento a que cada planta seria submetida, excluímos aqueles aplicados anteriormente em cada indivíduo. No início de cada período experimental, colocamos uma larva na superfície adaxial de cada planta hospedeira, de acordo com o tratamento definido pelo sorteio.

A proteção da planta hospedeira não parece ter efeito algum sobre a mortalidade das larvas. A temperatura e a umidade relativa dentro e fora da proteção em diversos horários do dia não apresentou diferenças significativas ($U = 74,50$; $p = 0,28$; $n = 14$).

Inspecionamos as larvas duas vezes ao dia para remover os escudos produzidos pelas larvas submetidas ao tratamento do escudo artificial e escudo removido. Na mesma ocasião, tocávamos levemente no final do abdômen as larvas com escudo intacto, para provocar uma perturbação similar àquela dos dois outros tratamentos.

No final de cada período experimental de três dias, registramos quais larvas permaneciam vivas e quais haviam desaparecido ou morrido. O desaparecimento ou morte foi pressuposto como predação.

Comparamos as proporções das larvas sobreviventes e desaparecidas entre os seis tratamentos utilizando o teste Q de Cochran (Zar 1999: p. 268). Este teste é utilizado quando são realizadas múltiplas medidas sobre um mesmo organismo experimental (no caso as plantas em cada período) para se obter replicações e quando a resposta do experimento é dicotômica (Zar 1999: p. 268), utilizando quando necessário um teste posterior de comparações múltiplas (Zar 1999: p. 270).

2. *Atividade de predadores no campo.*

Para avaliar a abundância e riqueza de potenciais predadores de larvas ao longo do dia na área de estudo acima, realizamos cinco varreduras com rede (38 cm. Ø) ("Sweep") na vegetação da trilha onde foram realizados os procedimentos de campo (Trilha do Lago Negro, Parque Estadual de Intervalos). Cada uma das varreduras foi realizada durante um período de 24 horas, a cada três horas, e tinha a duração de 15 minutos cada. Fixamos o material coletado imediatamente em etanol 70% e o triamos posteriormente em laboratório. No início deste procedimento, logo após a conclusão da última varredura realizada no período diurno e da última realizada no período noturno, vistoriamos as plantas sem proteção em que se encontravam larvas submetidas aos experimentos e registramos os desaparecimentos.

3. *O papel do escudo de fezes. Bioensaios em laboratório com predadores modelo.*

Como eventos de predação no campo raramente são observados, conduzimos bioensaios com diferentes predadores em laboratório para tentar compreender como ocorria a interação das larvas, com seus escudos, e diferentes predadores. Para isso, selecionamos dois modelos de predadores: *Camponotus crassus* (Hymenoptera: Formicidae: Formicinae), como predador invertebrado mandibulado e indivíduos jovens de *Gallus gallus* (Galliformes: Phasianidae), como predador vertebrado. Nestes bioensaios, larvas de terceiro e quarto ínstares foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- i. Larvas com escudo de fezes natural.
- ii. Larvas com o escudo de fezes removido.

iii. Larvas com o escudo substituído por um escudo artificial, constituído por fezes de *Spodoptera frugiperda* congeladas e liofilizadas (como descrito no ítem 1 deste capítulo).

Para a realização desses bioensaios utilizamos dois diferentes procedimentos, dependendo do modelo de predador testado.

3a. *Bioensaios usando formigas Camponotus crassus*

Coletamos colônias de *C. crassus* na Estação Experimental da Fazenda Campininha, Instituto Botânico, localizada no município de Mogi Guaçu (22°18'S, 47°10'O). Em laboratório elas foram acondicionadas em duas bandejas plásticas, uma quadrada (20x20x8cm - comprimento x largura x altura) onde permanecia a colônia das formigas, e outra bandeja circular, a arena de alimentação (15x7cm - diâmetro x altura), onde oferecíamos alimento e presas experimentais. As duas bandejas eram interligadas através de um tubo plástico inserido em uma das paredes. Tratamos a parte interna das paredes laterais das bandejas com Fluon[®] para evitar a fuga das formigas. As colônias das formigas foram mantidas em tubos de ensaio (18cm comprimento 2,5cm Ø) com algodão umedecido no fundo e envolvidos com papel de celofane vermelho. Cada colônia tinha a sua disposição permanentemente uma solução aquosa de sacarose 50% e, uma vez por semana, uma larva palatável congelada de 4° ou 5° instar da mariposa noctuídea *Spodoptera frugiperda* era fornecida. Essas larvas foram criadas em laboratório e alimentadas com dieta artificial, sem possíveis substâncias tóxicas (ver Ferraz 1991). Mantivemos as colônias à temperatura de 24°C e fotoperíodo 14:10 L:E. Cada colônia de formiga sempre foi avaliada como um predador individual (Portugal 2001). Os bioensaios

foram realizados sempre durante o dia (Dyer & Bower 1996). Conduzimos os experimentos na arena de alimentação para evitar a indução de um possível comportamento defensivo que as formigas poderiam apresentar próximo à colônia.

Para padronizar o limiar de fome da colônia e a habilidade de capturar presas, dois dias antes da realização do bioensaio, oferecemos à colônia uma larva controle palatável de 4^o ou 5^o instar de *S. frugiperda*. Esta larva era colocada no centro da arena, sendo oferecida sobre uma folha da planta hospedeira da larva do coleóptero a ser testado posteriormente. A folha tinha o pecíolo imerso em um vidro 10 ml com água e tampado com algodão, para que se mantivesse fresca durante todo o experimento. Se após 48 horas a larva de *S. frugiperda* não tivesse sido consumida nós descartávamos o experimento; caso contrário, o experimento prosseguia com a introdução da larva a ser testada colocada sobre uma folha fresca de sua planta hospedeira como acima. Vinte e quatro horas após o início do experimento, nós registrávamos a resposta das formigas obedecendo-se às seguintes categorias: 1. preda – caso as formigas tivessem atacado, matado e transportado a larva experimental para a colônia; nesse caso o bioensaio era considerado como encerrado; ou caso as formigas tivessem matado a larva experimental, mas não transportado. Neste último caso, o bioensaio foi considerado válido após oferecer uma segunda larva controle, de *S. frugiperda*, à colônia e estas serem consumidas. Se as larvas controles não fossem consumidas o bioensaio era descartado . 2. não preda – caso as formigas tivessem ignorado o organismo após as 24 horas. Nesta categoria o bioensaio foi considerado válido após oferecer larvas controles de *S. frugiperda* à colônia e avaliar como descrito na categoria 1. Para verificar se as formigas não alteram a sobrevivência das larvas testadas não predadas pelas formigas, estas foram mantidas individualmente até empuparem, nas condições de criação descritas na Introdução Geral desta tese.

As diferenças entre as proporções de larvas predadas ou não predadas em cada tratamento foram analisadas através do teste de comparação de proporções (Zar 1999: p. 562), utilizando quando necessário um teste posterior de comparações múltiplas (Zar 1999: p. 563).

3b. *Bioensaios usando aves Gallus gallus*

Obtivemos machos da espécie *G. gallus* com um dia de idade na Granja Ito, Campinas, SP ou Fazenda Aves do Paraíso, Itatiba, SP, e os mantivemos durante 8 dias em uma mesma gaiola (25°C, fotoperíodo ambiente). Alimentamos os animais com água e ração comercial *ad libitum*. No oitavo dia, os transferimos para gaiolas individuais (30 x 30 x 40cm), não se permitindo o contato visual entre eles, como sugerido por Brower (1957) e Begossi (1984). A mesma quantidade de alimento foi oferecida nos dias subsequentes para padronizar o estado de fome antes de cada experimento (Hilker & Köpf, 1994). Nos dias 9, 10 e 11, após os nascimentos dos *G. gallus* treinamos os mesmos a se alimentarem com larvas palatáveis de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) uma ou duas vezes por dia, entre 9:00 e 18:00 horas, período de maior atividade destes predadores. O objetivo do treinamento era evitar que predadores rejeitassem as presas experimentais por não terem contato prévio com as mesmas, sendo assim um item estranho a sua dieta. Antes de iniciarmos a dieta-treinamento submetemos os pintos a duas horas de jejum (sendo oferecido somente água), removendo a ração da gaiola e limpando-a para que não houvesse restos de alimento nas duas horas de jejum. A dieta-treinamento consistia de oferecer individualmente em placas de petri (6 cm de diâmetro) larvas de *T. molitor*. Essas larvas foram escolhidas por serem palatáveis. Permitíamos que os pintos tivessem contato

com a larva durante dois minutos antes de removê-la. Imediatamente após, oferecíamos ração e água ao predador, independentemente deste ter aceitado a presa ou não. Uma presa foi considerada aceita se tivesse sido ingerida nos dois minutos de experimento. Se apenas uma pequena parte da presa tivesse sido consumida por ter caído em local inacessível para o pinto (como por exemplo no vão entre a armação da gaiola e a tela), esta era considerada como completamente ingerida se o predador tivesse feito alguma tentativa de recuperar tal parte (ver Evans & Waldbauer, 1982). Uma presa era considerada rejeitada se dois minutos após ter sido oferecida ao predador não tivesse sido bicada. No caso da rejeição da larva, o procedimento era repetido posteriormente. Indivíduos que rejeitaram larvas em todas as tentativas de oferecimento não eram utilizados para os experimentos.

Antes de cada experimento, que ocorria no mesmo período do dia em que era realizada a “dieta-treinamento”, os pintos também eram mantidos em jejum por duas horas. Nós iniciávamos o experimento oferecendo uma larva controle de *T. molitor*. Se o pinto tivesse consumido o controle, em seguida oferecíamos uma larva experimental. Larvas experimentais consistiam de larvas de *P. flavescens* ou *S. areolata* submetidas aos tratamentos descritos anteriormente (introdução do item 3).

A reação do predador às larvas experimentais era observada por dois minutos e registrada dentro das seguintes categorias (modificado de Brower 1957): 1. comido, 2. rejeitado (bicado mas não predado), 3. ignorado. A presa era considerada ignorada caso os pintos não tivessem apresentado nenhuma reação frente às larvas após dois minutos do início do bioensaio. Caso a reação do pinto fosse “rejeitar” ou “ignorar” a larva experimental, nós oferecíamos em seguida uma segunda larva controle para confirmar estado de fome e aptidão dos pintos para atacar presas (Schlee 1986). Só considerávamos o bioensaio válido se ambas as larvas controles tivessem sido comidas; caso contrário o

mesmo era considerado inválido e era descartado. O mesmo indivíduo de *G. gallus* nunca foi submetido a mais que um bioensaio.

Mantivemos as larvas ignoradas e rejeitadas separadas individualmente até empuparem (Wiklund & Järvi 1982; Wiklund & Sillén-Tullberg 1985), nas condições de criação descritas na introdução geral desta tese. Utilizamos este procedimento para verificar se os danos provocados pela bicada afetariam a sobrevivência das larvas testadas. Para a análise estatística, desconsideramos larvas ignoradas porque nós não havíamos registrado se os pintos tiveram contato visual com as larvas, além de não podermos ter certeza se uma determinada larva havia sido ignorada por suas características visuais ou simplesmente porque o predador não a encontrou. As diferenças entre as proporções de larvas predadas ou rejeitadas em cada tratamento foram analisadas através do teste de comparação de proporções como acima.

4. *O papel de substâncias químicas presentes no escudo de Plagiometriona flavescens em sua proteção. Experimentos de campo*

Para verificar se os escudos de *P. flavescens* conferiam proteção às larvas devido à presença de substâncias impalatáveis, sem influência da barreira física, realizamos um experimento no campo utilizando o mesmo desenho experimental usado para testar o papel do escudo com larvas vivas (conforme descrito no item 1). Entretanto, ao invés de usar larvas de Cassidinae como presas, usamos larvas congeladas de terceiro instar de *Spodoptera frugiperda*. O terceiro instar foi escolhido porque nessa fase do desenvolvimento, as larvas da mariposa têm um tamanho similar às larvas dos besouros utilizadas no experimento de campo, descrito no item 1. As larvas de *S. frugiperda*

funcionaram como presas artificiais onde aplicamos as substâncias a serem testadas conforme os tratamentos abaixo.

- i. Larva tratada com extrato de escudo de fezes de *Plagiometriona flavescens*.
- ii. Larva tratada com metanol, solvente utilizado para ressuspender o extrato de escudo de fezes de *Plagiometriona flavescens* (tratamento controle do extrato).
- iii. Larva sem a aplicação de nenhuma substância.

Para prepararmos o extrato do escudo, removemos os escudos de larvas de todos os ínstaes, as quais eram mantidas na criação do laboratório, utilizando uma pinça maleável. Esse material foi mantido à -70°C até a extração química. Para a extração, transferimos os escudos de fezes para uma mistura de água, etanol e diclorometano (1:1:1), na proporção de 10:1 (volume:peso), e os maceramos. Seleccionamos os solventes mencionados por formarem uma mistura de diferentes polaridades e desta forma extrair um maior diversidade de substâncias presentes nos escudos. Homogeneizamos os escudos macerados em vórtex por dois minutos à velocidade média, e os ultrasonificamos por mais dois minutos. Deixamos o material à 4°C até que as fases aquosa e orgânica estivessem completamente separadas. O procedimento de extração foi repetido uma vez. Tratamos a fase orgânica com sulfato de sódio anidro para eliminar traços de água e posteriormente reduzimos seu volume em rota-evaporador a 25°C . O extrato aquoso foi liofilizado. Ressuspendemos ambos os extratos em uma pequena quantidade de metanol antes de misturá-los. Em seguida, adicionamos metanol em quantidade suficiente para atingir o volume final de extrato (de acordo com a massa utilizada de fezes escudos).

Calculamos a quantidade de extrato a ser aplicado em *S. frugiperda* considerando a razão “peso fresco de escudo/peso fresco do corpo de larva de *P. flavescens*”, a qual era

1,033. Uma vez que esta razão era próxima a 1,0 em uma larva congelada de *S. frugiperda*, a quantidade de extrato proveniente de uma porção de escudo do mesmo peso do corpo de larva de *S. frugiperda*, diluído em 30 µl de metanol. A aplicação era feita com o auxílio de uma microseringa de 100µl, poucas horas antes do início do experimento. Terminada a aplicação, nós imediatamente levamos as larvas para o campo onde foram coladas nas superfícies abaxiais plantas hospedeiras experimentais com o uso de cola branca, de acordo com os tratamentos estabelecidos acima. Em cada planta colocamos somente uma larva de *S. frugiperda* durante cada período experimental.

No início de cada experimento, fizemos um sorteio para determinar os tratamentos para cada planta hospedeira experimental. Como no desenho experimental utilizado no experimento de campo descrito anteriormente (item 1), um mesmo indivíduo de planta nunca esteve submetido ao mesmo tratamento por mais de uma vez. Para obter 30 repetições de cada tratamento utilizamos 30 indivíduos de *Aureliana fasciculata*, que foram submetidos a cada tratamento em seis períodos experimentais de dois dias cada. Experimentos preliminares indicaram que o período de dois dias era suficiente para expor larvas aos predadores, garantindo a atividade do extrato e conservação das larvas.

No final de cada período experimental verificamos se cada larva de *S. frugiperda* havia desaparecido, sofrido ataque (através de marcas de mordidas) ou se estava intacta. Para a análise estatística, registramos larvas com qualquer tipo de ataque com o valor 1 (um) e larvas intactas com o valor 0 (zero). Comparamos as proporções de larvas que desapareceram e se mantiveram intactas em cada tratamento através do teste Q de Cochran como acima.

5. *O papel de substâncias químicas presentes no escudo de Plagiometriona flavescens em sua proteção. Bioensaios de laboratório*

Para se tentar entender melhor como predadores respondem às substâncias presentes no escudo, realizamos bioensaios em laboratório com os mesmos modelos de predadores utilizados acima. Os tratamentos foram:

- i. Larvas de *Spodoptera frugiperda* com a aplicação do extrato metanólico do escudo de fezes.
- ii. Larvas de *Spodoptera frugiperda* com a aplicação de metanol.
- iii. Larvas de *Spodoptera frugiperda*, sem a aplicação de nenhuma substância.

As diferenças entre as proporções de larvas predadas ou não predadas em cada tratamento foram analisadas como acima.

6. *Custos para a manutenção dos escudos.*

Considerando que os Cassidinae são altamente adaptados para a deposição de fezes em seu abdômen (devido à presença do intestino protrátil para levar as fezes à furca, estrutura que mantém reunidas), pressupomos que o custo da manutenção dos escudos seria melhor avaliado através de parâmetros de desempenho e sobrevivência de larvas de *P. flavescens* e *S. areolata*, com ou sem escudos (ver também Olmstead & Denno 1992). Para isso nós desenvolvemos dois experimentos, um em campo e outro no laboratório.

6a. *Experimento de campo*

No período dentro de 24 horas após a eclosão do ovo, levamos as larvas recém emergidas para o campo. Introduzimos estas larvas em grupos de quatro indivíduos em plantas hospedeiras, colocadas previamente na trilha. Indivíduos de

P. flavescens foram colocados em folhas diferentes da planta hospedeira, enquanto que *S. areolata* foram colocadas em uma mesma folha da planta. Este procedimento foi adotado para reproduzir o comportamento de larvas recém emergidas; o tamanho do grupo (quatro indivíduos) representa a quantidade média observada no campo de larvas de primeiro e segundo instares por indivíduo de planta hospedeira (Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto 2003b). Cada grupo de larvas foi submetido a um dos quatro tratamentos descritos abaixo:

- i. Larvas com seus escudos mantidos.
- ii. Larvas com seus escudos removidos.

Neste experimento utilizamos 19 indivíduos de *C. pinnatifida*, sendo 10 indivíduos submetidos ao tratamento i e nove indivíduos submetidos ao tratamento ii. Também utilizamos 14 indivíduos de *A. fasciculata*, sendo sete indivíduos submetidos a cada um dos tratamentos.

Desde o primeiro dia, quando introduzimos as larvas nas plantas, verificamos as mesmas duas vezes por dia (uma logo ao amanhecer e outra pouco antes de escurecer), para remover os escudos recém produzidos por larvas submetidas aos tratamentos sem escudo. Esta remoção foi feita utilizando um pincel fino, para larvas mais jovens, e uma pinça maleável, para as larvas mais velhas. Nas mesmas ocasiões, nós sempre tocamos levemente o abdômen de larvas dos tratamentos com escudo, para poder repetir a perturbação provocada em larvas submetidas aos tratamentos sem escudo. Ao verificar as larvas, nós registrávamos se alguma havia desaparecido, assumindo, neste caso, que estas haviam sido predadas. Realizamos este procedimento até que as larvas empupassem.

Diferenças entre as proporções de mortalidade em cada tratamento foram analisadas através do teste de comparação de proporções como acima. As curvas de sobrevivência de larvas submetidas a cada um dos quatro tratamentos foram comparadas 2x2 pelo teste Log-Rank (Krebs 1998), considerando a correção de Bonferroni (Zar 1999).

6b. Experimento de laboratório

Vinte quatro horas após emergirem dos ovos, individualizamos larvas de *Stolas areolata* e *Plagiometriona flavescens* em recipientes plásticos (4 cm Ø, 5 cm altura) contendo um ramo de sua planta hospedeira. Estas larvas foram separadas em dois grupos experimentais:

- i. Larvas com escudos mantidos.
- ii. Larvas com escudos removidos.

Antes do início do experimento, para eliminar microorganismos que poderiam afetar a sobrevivência das larvas, lavamos os recipientes com água e sabão, posteriormente com etanol, e os colocamos sob luz ultravioleta durante 45 minutos. O mesmo tratamento era feito para as folhas de plantas hospedeiras a serem oferecidas às larvas. Mantivemos as larvas experimentais com folhas de suas respectivas plantas hospedeiras, nesses recipientes, em câmara de criação à temperatura constante de 27°C e fotoperíodo 14:10 L:E e umidade relativa não controlada. Envolvermos a extremidade cortada do pecíolo das folhas/ramos com um pequeno pedaço de algodão umedecido com água destilada para evitar a desidratação da planta. As folhas, coletadas de indivíduos cultivados na casa de vegetação do laboratório, foram trocadas a cada dois dias.

Repetimos este procedimento até que todas as larvas empupassem. Diariamente,

removíamos os escudos de larvas do grupo experimental “sem escudo” como acima; no grupo em que o escudo foi mantido, causamos uma perturbação nas larvas, tocando levemente o abdômen o auxílio do pincel, para simular a perturbação causada em larvas submetidas aos tratamentos “sem escudo”.

Calculamos as taxas de consumo relativo e crescimento relativo em 24 horas para larvas de quinto instar de *P. flavescens* e de quarto instar de *S. areolata* (segundo metodologia modificada de Miller & Feeny 1983). Utilizamos o peso fresco das larvas e das folhas ao invés do peso seco.

Taxa de crescimento relativo = (Peso inicial da larva – peso final da larva)/Peso inicial da larva

Taxa de consumo relativo = (Peso inicial da folha – peso final da folha)/Peso inicial da larva

Ao atingirem a fase de pupa, nós removemos a planta hospedeira de dentro do pote e após 24 horas pesamos cada pupa individualmente. O mesmo procedimento foi usado para os adultos recém emergidos.

Comparamos o tempo de desenvolvimento de larvas, o tempo de desenvolvimento de pupas, o peso de pupas, o peso de adultos, a taxa de consumo relativo e a taxa de crescimento relativo entre os dois grupos experimentais através do teste Mann-Whitney (Zar 1999). Comparamos as proporções de mortalidade dos dois grupos experimentais através do teste de comparação de proporções (Zar 1999: p. 562). Calculamos a relação entre a taxa de consumo relativo e taxa de crescimento relativo de larvas criadas com escudo e sem escudo e as retas obtidas foram comparadas através de ANCOVA (Zar 1999).

RESULTADOS

1. O papel do escudo de fezes. Experimentos de campo

Verificamos que em plantas protegidas as porcentagens de mortalidade de larvas de *P. flavescens* e *S. areolata* submetidas aos 3 diferentes tratamentos não diferiam significativamente, variando entre 0-13%. Em plantas sem proteção, para ambas as espécies, as porcentagens de mortalidade de larvas com o escudo natural foram significativamente menores do que as de larvas com escudo artificial ou com escudo removido ($Q = 18,86$; $gl = 5$; $p = 0,002$ para *P. flavescens* e $Q = 25,23$; $gl = 5$; $p < 0,001$ para *S. areolata*, Figura 1.3).

2. Atividade de predadores

A maioria dos potenciais predadores que coletamos foram aracnídeos (aranhas e opiliões), sendo observados predando principalmente larvas sem escudos. Poucas formigas e hemípteros foram coletados. Durante a noite coletamos maior abundância de organismos, principalmente opiliões.

A predação de larvas de *S. areolata* foi significativamente mais freqüente no período noturno ($\chi^2 = 4,90$; $gl = 1$; $p = 0,027$) (Figura 1.4), enquanto que para *P. flavescens* a predação não se diferenciou nos dois períodos ($\chi^2 = 0,034$; $gl = 1$; $p = 0,850$) (Figura 1.4). Em três ocasiões, durante o período diurno, observamos aranhas das espécies *Misumenops* sp. (Thomisidae), *Achaearanea tessellata* e *Theridium calcynatum* (Theridiidae) predando larvas de *S. areolata* ou *P. flavescens*. Também observamos em uma ocasião uma larva de *P. flavescens* sendo predada por uma planária (espécie não identificada).

3. *O papel do escudo. Bioensaios de laboratório*

3a. *Bioensaios usando formigas Camponotus crassus*

No bioensaio utilizando *C. crassus* como predador, foram predadas 6,67% das larvas de *P. flavescens* que tinham seu escudo mantido, 18,51% das larvas sem escudo e 13,33% das larvas com escudo artificial. Entretanto, o teste de comparação de proporções não revelou diferenças significativas na proporção de larvas predadas em cada um dos tratamentos investigados ($\chi^2 = 1,82$; gl = 2; p = 0,40; Figura 1.5). Observamos nesse bioensaio que ao tocarem nos escudos naturais, as formigas tentavam limpar suas antenas e pressionavam as mandíbulas contra o substrato, para remover os prováveis compostos impalatáveis presentes nos escudos.

Nos bioensaios com larvas de *S. areolata*, as porcentagens de predação de larvas com escudo, sem escudo e com escudo artificial foram, respectivamente, 7,69, 10,71 e 19,23%, as quais não apresentavam diferenças significativas ($\chi^2 = 1,71$, gl = 2, p = 0,43; Figura 1.6). Entre as larvas que foram mortas pelas formigas, poucas foram levadas para o ninho e consumidas; a maioria foi deixada na própria arena de alimentação. Larvas de *C. crassus* também apresentavam comportamento de limpar as mandíbulas após o contato com os escudos naturais de *S. areolata*.

3b. *Bioensaios usando aves Gallus gallus*

Verificamos que larvas de *P. flavescens* com o escudo natural mantido eram menos predadas (57,14%) do que larvas com o escudo artificial (71,42%) e larvas sem escudo foram as mais predadas entre os três tratamentos (89,47%), sendo essa diferença marginalmente significativa ($\chi^2 = 5,20$; gl = 2; p = 0,074, Figura 1.7). Observamos que

larvas que são rejeitadas morriam logo após serem bicadas e não completando seu desenvolvimento até pupa.

Larvas de *S. areolata* raramente foram predadas pelos pintos. Nenhuma larva com o escudo natural foi predada e somente 14,29% das larvas sem escudo e 11,11% das larvas com escudo artificial foram predadas por *G. gallus*, sendo essas diferenças não significativas ($\chi^2 = 1,92$, gl = 2, p= 0.,38; Figura 1.8). Assim como em *P. flavescens*, larvas de *S. areolata* rejeitadas, apesar de terem sido liberadas vivas, acabavam não completando seu desenvolvimento até pupa.

4. *O papel de substâncias químicas presentes no escudo de Plagiometriona flavescens em sua proteção. Experimentos de campo*

Neste experimento verificamos que havia diferença significativa no desaparecimento de larvas de *S. frugiperda* submetidas a cada um dos três diferentes tratamentos (Q = 22,46; gl = 2; p < 0.01; Figura 1.9). Verificamos que significativamente menos larvas tratadas com o extrato do escudo desapareceram em comparação com larvas tratadas somente com solvente e larvas naturais (10% de desaparecimento de larvas com extrato contra 63 e 70% nos demais tratamentos, respectivamente).

5. *O papel de substâncias químicas presentes no escudo de Plagiometriona flavescens em sua proteção. Bioensaios de laboratório*

5a. *Bioensaios usando formigas Camponotus crassus*

Encontramos diferenças significativas no consumo de presas submetidas aos três tratamentos ($\chi^2 = 14,60$; gl = 2; $p < 0,001$; Figura 1.10). Verificamos que larvas de *S. frugiperda* tratadas com extrato de escudo foram significativamente menos predadas do que larvas tratadas com solvente ou larvas naturais. Observando o comportamento das formigas ao contatarem as presas oferecidas, verificamos que no primeiro contato as formigas tentavam carregar as larvas. Entretanto, quando a larva havia sido tratada com extrato de escudo, as formigas apresentavam o comportamento de limpar as antenas e pressionar as mandíbulas contra o substrato, para provavelmente remover compostos impalatáveis.

5b. *Bioensaios usando aves Gallus gallus*

Encontramos diferenças significativas no consumo de larvas submetidas ao três tratamentos ($\chi^2 = 14,04$; gl = 2; $p < 0,001$; Figura 1.11). Verificamos que larvas de *S. frugiperda* tratadas com o extrato do escudo foram significativamente menos predadas do que larvas tratadas com solvente e larvas naturais. Após rejeitarem as larvas tratadas com extratos, algumas vezes, os pintos limpavam o bico, pressionando-os contra o fundo da gaiola.

6. Custos para a manutenção dos escudos

6.1. *Plagiometriona flavescens*

Para *P. flavescens* verificamos, no experimento de campo, que a mortalidade de larvas com ou sem escudos diferiu estatisticamente, sendo que larvas em que mantivemos os escudos tiveram sobrevivência significativamente maior do que larvas em que removemos o escudo ($\chi^2 = 4,31$; gl = 1; $p < 0,038$; Figura 1.12). Também não observamos diferenças significativas na duração do estágio larval ($U = 27,50$; $p = 0,80$).

Em laboratório, larvas de *P. flavescens* criadas com o escudo mantido não diferiram significativamente, quanto à sobrevivência, quando comparadas às larvas sem escudo ($\chi^2 = 0,94$; gl = 1; $p = 0,33$; Figura 1.13). Também não encontramos diferenças significativas entre o tempo de desenvolvimento de larvas submetidas aos dois tratamentos ($U = 784$; $p = 0,31$; Figura 1.14A), entre o tempo de desenvolvimento de pupas ($U = 541,50$; $p = 0,13$; Figura 1.14B), entre os pesos de pupas ($U = 676$, $p = 0,14$; Figura 1.14C) e adultos ($U = 335$, $p = 0,33$; Figura 1.14D). Verificamos que a taxa de crescimento relativo de larvas de quinto instar criadas sem escudo foi significativamente maior do que o de larvas criadas com o escudo ($U = 815$; $p = 0,033$; Figura 1.14E). Entretanto, as taxas de consumo relativo foram similares para larvas com ou sem escudo ($U = 1035$; $p = 0,65$; Figura 1.14F). O consumo explicou somente 11,78% do crescimento de larvas de quinto instar de *P. flavescens* criadas com escudo (Figura 1.15) e 28,57% das sem escudo (Figura 1.15). Verificamos que as inclinações das retas das regressões lineares de larvas com ou sem escudo não foram significativamente diferentes ($F = 0,16$; gl = 1; $p = 0,69$), mas ocorreu

diferença significativa entre as elevações de ambas as retas ($F = 4,045$; $gl = 1$; $p = 0,047$) (Figura 1.15), indicando que ao consumirem uma mesma quantidade de alimento, larvas sem escudo tiveram o crescimento maior do que larvas com escudo.

6.2. *Stolas areolata*

Para *S. areolata* verificamos, no experimento de campo, que larvas que tiveram seu escudo removido apresentaram sobrevivência maior do que larvas em que mantivemos o escudo. Entretanto essa diferença não foi significativa ($\chi^2 = 0,82$; $gl = 1$; $p = 0,36$, Figura 1.16). Também não observamos diferenças significativas na duração do estágio larval ($U = 72$; $p = 0,29$).

No experimento de laboratório, verificamos que a mortalidade de larvas de *S. areolata* que tinham seu escudo mantido era significativamente maior do que o de larvas sem escudo ($\chi^2 = 7,80$; $p = 0,005$; Figura 1.17). Não detectamos diferenças significativas na duração do estágio larval de *S. areolata* submetido aos dois tratamentos ($U = 591,5$; $p = 0,88$; Figura 1.18A), no tempo de desenvolvimento de pupas ($U = 316$; $p = 0,86$; Figura 1.18B), e no peso de pupas ($U = 540,50$; $p = 0,48$; Figura 1.18C) e de adultos ($U = 284$; $p = 0,98$; Figura 1.18D). Verificamos que as taxas de consumo relativo foram similares para larvas com ou sem escudo ($U = 648$; $p = 0,729$; Figura 1.18E). Entretanto, larvas sem escudo apresentaram taxa de crescimento relativo marginalmente maior do que larvas com escudo ($U = 500$; $p = 0,051$; Figura 1.18F). O consumo explicou 21,4% do crescimento de larvas de quarto instar de *S. areolata* criadas com escudo (Figura 1.19) e 14,89% de

larvas sem escudo (Figura 1.19). Verificamos que as inclinações das retas das regressões lineares de larvas com ou sem escudo não foram significativamente diferentes ($F = 2,10$; $gl = 1$; $p = 0,15$), mas existiu diferença significativa entre as elevações de ambas as retas ($F = 6,065$; $gl = 1$; $p = 0,016$) (Figura 1.19). Assim como para *P. flavescens*, este resultado indicou que ao consumirem uma mesma quantidade de alimento, larvas de *S. areolata* sem escudo tiveram o crescimento maior do que larvas com escudo.

DISCUSSÃO

1. A proteção devido ao escudo de fezes é de natureza física? Respostas de experimentos de curto prazo no campo e no laboratório.

Em todos os experimentos realizados em campo, as diferenças significativas encontradas na remoção de larvas *P. flavescens* e *S. areolata* ou presas colocadas em plantas protegidas em comparação com aquelas em plantas desprotegidas, sugerem um papel importante da predação na sobrevivência das larvas estudadas. Pelo menos no Parque Intervales, pôde-se verificar que a frequência de ataques foi tão alta que, mesmo em experimentos curtos, de dois ou três dias de duração, foi possível obter esta informação. Desta forma, pode-se sugerir a importância para estas larvas desenvolverem estratégias defensivas.

Diferentes experimentos descritos neste capítulo demonstraram resultados variados em relação à eficiência de escudos de fezes de *P. flavescens* e *S. areolata*. Esses resultados reforçam que a presença dos escudos pode provocar respostas variadas em predadores de larvas de diferentes espécies e que esta variação não parece estar relacionada com o tipo de material que constitui o escudo, fezes, exúvias ou ambos, já que as duas espécies estudadas tinham o escudo formado por fezes e exúvias.

Entretanto, nos experimentos de curto prazo no campo encontrei um mesmo padrão, tanto para *P. flavescens* e *S. areolata*, no qual a ausência de diferença significativa na mortalidade de larvas vivas sem escudo e com escudo artificial indicou que a proteção não ocorria devido à barreira física representada pelo escudo. Desta forma, assim como em Morton & Vencl (1998), Vencl & Morton (1998) e Vencl *et al.* (1999), os resultados obtidos neste trabalho levam a rejeição da hipótese da natureza física da defesa pelo escudo. Morton & Vencl (1998), Vencl & Morton (1998) e Vencl *et al.* (1999) também substituíram escudos de *Lema trilinea*, *Neolema sexpunctata*, *Blepharida rhois* e *Plagiometriona clavata* (todos Chrysomelidae de diferentes subfamílias) por escudos artificiais e mostraram que estes não protegiam as larvas e que a deterrência de inimigos naturais era causada por compostos químicos presentes nos escudos naturais.

Ainda não se conhece caso algum em que o escudo seja capaz de proporcionar proteção de natureza física para a larva. Existem sugestões que escudos poderiam proteger larvas devido à barreira física (Root & Messina 1983; Eisner & Eisner 2000; Müller 2002; Müller & Hilker 2003), mas com exceção dos experimentos descritos nesta tese e nos trabalhos de Vencl e Morton citados acima, a eficiência da barreira física não foi testada especificamente.

Os bioensaios em laboratório não comprovaram os resultados obtidos no campo. As formigas *C. crassus* contataram larvas de *P. flavescens* poucas vezes e não houve recrutamento para o ataque da larva. Nos bioensaios com *S. areolata* em ninhos de *C. crassus* as larvas foram bastante atacadas, mas poucas foram predadas, independentemente do tratamento aplicado. Entretanto, o comportamento que formigas apresentaram de limpar as antenas e mandíbulas indicam que os escudos de *P. flavescens* e *S. areolata* apresentam substâncias impalatáveis (Eisner *et al.* 1967; Morton & Vencl 1998). Portanto, pode-se

concluir que os escudos não representam uma barreira física contra ataques de formigas e que as substâncias químicas presentes são capazes de deter as formigas e os pintos.

2. Substâncias químicas presentes no escudo de fezes influenciam na proteção de larvas de *Plagiometriona flavescens*?

Com os resultados dos experimentos para testar a proteção física, foi possível sugerir que a defesa das larvas ocorria devido aos compostos químicos, presentes nos escudos de ambas as espécies. A rejeição de presas com extrato de escudo de *P. flavescens* em experimentos em campo e em laboratório confirmaram a importância dos compostos químicos presentes no escudo para que larvas fossem rejeitadas por predadores.

Entretanto, a proteção efetiva de *P. flavescens* contra *G. gallus* ainda merece ser estudada mais detalhadamente. Devido ao fato de larvas com o escudo natural mantido ou presas de *S. frugiperda* tratadas com extrato terem sido frequentemente rejeitadas, não se pode considerar esta rejeição como vantajosa para as larvas, já que estas acabam não sobrevivendo devido ao ferimento provocado pela bicada. Portanto, não se pode concluir que larvas de *P. flavescens* sejam protegidas contra aves devido aos compostos químicos impalatáveis do seu escudo, a menos que os pintos sejam capazes de associar a imagem do escudo com a impalatabilidade e desenvolver aversão a larvas com escudo. O aprendizado da aversão baseado em impalatabilidade é possível, e já foi demonstrado em diversos exemplos com aves como *Parus major*, *P. ater* (Hilker & Köpf 1994), e inclusive para *G. gallus* (Begossi & Benson 1988; Hough-Goldstein *et al.* 1993; Silva 2000). Neste caso, a evolução da defesa pelo escudo poderia ocorrer pela seleção de parentesco ou "barba verde", assim como deve ter ocorrido para a evolução da coloração de advertência (Guilford 1990).

Como não podemos afirmar quem são os predadores mais efetivos na situação natural, os resultados dos bioensaios no laboratório indicaram que os compostos têm atividade pelo menos contra a formiga *C. crassus* e potencialmente contra a ave *G. gallus*.

O papel de compostos químicos na defesa por escudos de fezes contra predadores já foi demonstrado em outros estudos envolvendo crisomelídeos. De acordo com as revisões de Olmstead (1994), Jolivet & Verma (2002) e Müller & Hilker (2003), compostos provenientes do escudo compõem uma estratégia defensiva comum para larvas de crisomelídeos. Morton & Vencl (1998), Vencl & Morton (1998), Vencl *et al.* (1999), Gómez *et al.* (1999) e Evans *et al.* (2000) demonstraram que as substâncias defensivas presentes nos escudos de diversas espécies de Chrysomelidae eram obtidas da planta hospedeira, algumas vezes com transformações.

Apesar de termos testado vários métodos de extração, não conseguimos identificar as substâncias presentes nos escudos e, portanto, não podemos apontar quais seriam as importantes em defender larvas de *P. flavescens*. De acordo com Hsiao (1986), existem relativamente poucas espécies de Chrysomelidae que são capazes de usar espécies de Solanaceae como hospedeiras, e a maioria daquelas espécies que as usam não é fisiologicamente capaz de sequestrar as substâncias tóxicas da planta. Por esta razão era esperado encontrar substâncias provenientes da planta hospedeira nas fezes das larvas, originando uma defesa pouco custosa. Vencl *et al.* (1999) detectaram, em escudos de *Plagiometriona clavata*, alcalóides esteroidais, saponinas, ácidos graxos e derivados de fitol. Com exceção dos ácidos graxos, todos os metabólitos presentes no escudo tinham precursores na planta hospedeira, *Solanum dulcamara* (Solanaceae), e esses compostos provavelmente são responsáveis pela proteção de larvas contra predação. Nós não detectamos glicoalcalóides esteroidais em folhas *Aureliana fasciculata*, apesar desses

alcalóides serem comumente encontrados em Solanaceae, inclusive em *Aureliana lucida* (Brown 1987). No futuro deveriam ser realizados bioensaios testando extrato da planta hospedeira para que se possa ter uma indicação sobre a utilização de substâncias provenientes de *A. fasciculata* na defesa pelo escudo. Em escudos de *S. areolata* e em folhas de *Calea pinnatifida* detectamos sesquiterpenos que poderiam ser os responsáveis pela atividade dos escudos no experimento de campo. Entretanto, o papel de terpenos em escudos merece ser investigado mais especificamente já que Gómez *et al.* (1999) verificaram que estas substâncias poderiam proteger *E. nigrosignata* (Cassidinae), enquanto que Müller & Hilker (1999) verificaram que estas mesmas substâncias eram usadas como pistas para a formiga *Myrmica rubra* encontrar larvas de *Cassida denticollis* e *C. sanguinosa* (Cassidinae).

Evans *et al.* (2000) investigaram a proteção de larvas do gênero *Blepharida* (Alticinae) que consumiam *Bursera* (Burseraceae). Nesse trabalho foram identificadas duas estratégias defensivas utilizadas por diversas espécies de *Blepharida*: cobrir-se com fezes e apresentar o comportamento de movimentar o abdomen. *Blepharida schlechtendalii* apresenta escudos de fezes em que foi identificada uma mistura de monoterpenos bastante parecida com a presente em sua planta hospedeira, *Bursera schlechtendalii*. Por outro lado, *B. flavocostata* consumia *Bursera biflora*, uma espécie que apresenta uma mistura complexa de voláteis, e apresentava o comportamento de defesa. Esses autores sugerem que plantas que apresentam uma química complexa dificultam a utilização de seus compostos por herbívoros; como ilustrado pelo caso de *Blepharida schlechtendalii* e *B. flavocostata* (Evans *et al.* 2000). Portanto, uma hipótese para explicar a ausência em *P. flavescens* da classe de compostos encontrados por Vencel *et*

al. (1999) em *P. clavata* (também consumindo uma Solanaceae) poderia ser a maior complexidade química de *A fasciculata* em relação a *S. dulcamara*.

3. O escudo de fezes representa um custo? Resultados de experimento de longo prazo

Considerando os resultados discutidos até o momento, pode-se considerar que tanto os escudos de *P. flavescens* quanto de *S. areolata*, seriam eficientes para proteger as larvas. Na hipótese inicial deste capítulo nós prevemos que, caso fosse verificado que os escudos protegessem as larvas, este tipo de defesa poderia ser considerado como relativamente barato pela utilização de produtos reciclados. Assim como foi verificado no trabalho Olmstead & Denno (1992), nós também obtivemos dados que mostraram que a manutenção dos escudos não representa custos para larvas de ambas as espécies estudadas. Como visto pelo tempo de desenvolvimento de larvas e pupas e pesos de adultos e pupas, o desempenho de larvas com ou sem escudos, criadas em laboratório e no campo, foi similar. A única exceção foi o fato de que larvas sem os escudos, de ambas as espécies, apresentaram melhor aproveitamento de sua planta hospedeira do que larvas com escudo. Isto é, apresentaram maior taxa de crescimento relativo consumindo a mesma quantidade de alimento do que larvas com o escudo mantido. Desta forma parecem converter mais eficientemente o alimento para o seu crescimento. Isso pode representar um fator negativo para larvas que mantêm o escudo já que um reflexo dessa melhor conversão poderia ser, ao menos potencialmente, uma melhor aptidão da larva ou mesmo do adulto.

Os resultados dos experimentos de longa duração utilizando-se larvas de *S. areolata* mostram uma situação paradoxal: apesar dos escudos terem sido demonstrados, em experimentos curtos, como uma estrutura eficiente na proteção de larvas de 3^o e 4^o instares

de ambas as espécies no campo, considerando todo o desenvolvimento da larva os resultados foram diferentes, sendo que os escudos não foram eficientes na proteção e sua manutenção é custosa. Uma explicação para esta variação nos resultados seria que larvas de 3^o e 4^o instares de ambas as espécies apresentam uma taxa de sobrevivência constante durante este período do seu desenvolvimento (como pode ser visto nas curvas de sobrevivência). Portanto, o experimento de curta duração foi realizado na fase em que as pressões causadoras de mortalidade não eram tão fortes.

No experimento de laboratório de *S. areolata*, onde havia uma situação em que algumas condições ambientais eram controladas e predadores estavam ausentes, a sobrevivência de larvas com escudos foi significativamente menor, confirmando que escudos são prejudiciais às larvas e a sua mortalidade no campo não pode ser explicada pela maior atração de predadores e parasitóides, como foi observado por Müller & Hilker (1999) e por Schaffner & Müller (2001). Observamos que escudos de *S. areolata* e *P. flavescens* frequentemente apresentavam fungos e que algumas larvas mortas de *S. areolata* pareciam doentes. Contudo, não se sabe se nos escudos podem ser encontrados microorganismos patogênicos.

Portanto, considerando os resultados dos experimentos de campo e de laboratório, pode-se sugerir que o escudo de *S. areolata* possa proteger larvas contra fatores abióticos. Na situação em laboratório, larvas que tinham seu escudo intacto apresentaram mortalidade significativamente mais alta, mas no campo não encontramos diferenças nas proporções das mortalidades de larvas com ou sem escudos colocadas em plantas protegidas. Esse resultado indica que no campo larvas com escudo mantido provavelmente morriam devido a doenças provenientes do escudo, enquanto que larvas sem escudo provavelmente

morreram por influência de fatores abióticos, como temperatura, que seria tamponada pelo escudo.

Por outro lado, considerando os resultados dos experimentos longos de campo e de laboratório para verificar o custo do escudo de *P. flavescens*, pudemos confirmar que a presença do escudo é vantajosa para larvas, tendo um importante papel na proteção de larvas.

Deste modo, a última parte deste capítulo demonstrou a função de proteção contra predadores do escudo de *P. flavescens* mas em *S. areolata* esta não existe. Como mencionado por Schaffner & Müller (2001), a verdadeira razão da ocorrência (*raison-d'être*) dos escudos deve ser avaliada considerando todo o contexto em que as larvas se desenvolvem. Ridley (1996) também sugere que um padrão correto para se investigar a função de uma determinada adaptação seria avaliar sua contribuição para a aptidão do organismo durante toda a sua vida. Desta forma, nós enfatizamos a importância de experimentos de longa duração para se compreender a ecologia de uma espécie. Mecanismos de defesa são geralmente testados em bioensaios de curta duração, e nesta tese nós demonstramos que este tipo de procedimento não fornece informações suficientes para se entender o papel de uma determinada estratégia no contexto da espécie estudada no seu ambiente. Por isto, sugerimos que experimentos longos sempre devem ser preferidos quando se tem o objetivo de obter informação precisa sobre a influência de uma característica na vida do organismo.

4. Por que larvas mantêm os escudos de fezes?

Considerando-se que nem todas as espécies de Cassidinae adornam-se com fezes na fase larval (Windsor *et al* 1992; Olmstead 1996), fica a questão sobre o motivo pelo qual

os escudos são mantidos, principalmente em *S. areolata*, já que estes não oferecem vantagem na defesa contra predadores. Uma possibilidade é que o escudo ou as estruturas morfológicas responsáveis pela sua existência sejam mantidos por outras pressões seletivas que não estejam relacionadas com a proteção contra predadores. É possível que estas estruturas tenham evoluído com outra função, além da proteção contra predadores. Muitos órgãos são adaptados para exercerem mais do que uma função (Futuyma 1993). Desta forma, estas estruturas podem ter se desenvolvido para uma função, que não é mais importante no presente, e exercer uma nova ou única função não relacionada com a razão do seu desenvolvimento (Futuyma 1993).

O escudo de *P. flavescens* tem uma importante função na proteção de larvas. Entretanto, no caso de *S. areolata*, é possível que o escudo tenha se desenvolvido para proteger larvas contra predadores e contra fatores abióticos, mas atualmente tenha perdido a primeira função. Apesar do escudo aumentar a mortalidade em condições ambientais favoráveis (de temperatura, ausência de chuva e insolação – como no experimento de laboratório), na situação de campo não encontramos diferença na mortalidade de larvas criadas com ou sem escudo. Portanto, como sugerido anteriormente, este fato pode indicar a importância do escudo de *S. areolata* em proteger contra condições ambientais menos favoráveis. Neste caso, manter os escudos não seria tão desvantajoso.

Uma vez que, para *S. areolata*, a presença do escudo não altera a sobrevivência de larvas em situação natural, alternativamente, a manutenção do mesmo pode ser explicada por razões relacionadas ao passado das espécies de Cassidinae. Pouca mudança de um caráter, ao longo do tempo, também pode acontecer por limitação filogenética (Gould & Lewontin 1979). Devido ao fato de existirem exemplos de espécies próximas cujos escudos são eficientes em proteger larvas e não são custosos, espécies próximas a essas

podem ter mantido essas estruturas. *Charidotela bicolor*, *Deloyala guttata* e *Chelymorpha cassidea* (todos Cassidinae) também apresentam escudos e Olmstead & Denno (1992) verificaram, em experimentos de longa duração semelhantes aos desenvolvidos nesta tese, que os escudos representam uma estrutura que não apresentam custo para o desempenho de larvas e eficiente como defesa. Portanto, a presença do escudo de fezes em espécies proximamente relacionadas e sua eficiência em proteger as larvas poderiam explicar porque esta estrutura é mantida *S. areolata*.

É possível que este caráter, sendo desvantajoso para larvas, não persista com o tempo. Maynard-Smith *et al.* (1985) sugere que se um caráter permanece virtualmente sem mudança durante milhões de anos, isto pode refletir limitações de desenvolvimento, reduzindo a possibilidade de mudanças. Pouca mudança evolutiva também pode acontecer por limitação filogenética. (Gould & Lewontin 1979). Ambos os tipos de limitações mencionados podem ser testadas pela variabilidade genética (Maynard-Smith *et al.* 1985; Futuyma *et al.* 1993; Ridley 1996). Se um caráter não é variável geneticamente, isto pode evitar sua mutação (Ridley 1996). Considerando-se que escudos e furca apresentam uma grande variação morfológica (Buzzi 1988; Windsor *et al.* 1992; Olmstead 1996; veja tabela 1.1), pode-se esperar que não exista limitação genética. Para *S. areolata* é possível que larvas percam sua habilidade de juntar fezes e exúvias e apresentar outras estratégias alternativas. Larvas de *S. areolata* apresentam substâncias defensivas (capítulo 2) e isto pode ser uma defesa importante para esta espécie.

Concluindo-se, o trabalho apresentado neste capítulo rejeita a hipótese de que escudo de *S. areolata* seja eficiente em proteger larvas contra predadores. Por outro lado, os resultados obtidos em experimentos utilizando *P. flavescens* demonstram que o escudo tem papel defensivo, de natureza química. De qualquer forma, ainda não se conhece

contra que tipos de predadores o escudo realmente protege eficientemente, nem que tipo de pressão de inimigos levou o desenvolvimento desta estrutura. Informações como estas poderiam facilitar o entendimento da eficiência dos escudos. Como afirmado por Müller & Hilker (2003), generalizações sobre a eficiência da proteção pelo do escudo são difíceis de serem feitas já que este varia tanto de acordo com as espécies de predadores com que interage e com a planta hospedeira do besouro. Além disso, inimigos naturais podem ser capazes de se adaptarem contra este tipo de defesa ao longo do tempo tornando-se imunes a ela (Müller Hilker 1999; Schaffner & Müller 2001).

Tabela 1.1. Características de escudos e larvas de Cassidinae pertencentes a diferentes tribos, com ocorrência no Brasil (de acordo com Buzzi 1988 e Lenice Medeiros com. pess.)

Tribo	Espécie	Observações sobre o escudo	Observações sobre a larva
Hemisphaerotini	<i>Spathiella tristis</i>	Forma de cesta (larva dentro)	Furca longa
Physonotini	<i>Cistudinella sp</i>	Composto só por exúvia	
Omocerini	<i>Omocercus antiqua</i>	Ausente	Vermelha, furca mede 0,5 mm
	<i>Cassidinoma denticulata</i>	Ausente	Manchas amarelas, pretas e cinzas Furca mede 6 mm de comprimento
Goniocheniini	<i>Polychalma bicornuta</i>	Forma de concha	Furca mede 2 mm de comprimento e é mais espessa na base
	<i>Chlamydocassis metallica</i>	Forma de concha, fezes rígidas	Furca mede 0,5 mm de comprimento e é mais espessa na base
Dorynotini	<i>Dorynota pugionata</i>	Fezes filiformes e dispostas como um leque atrás das exúvias.	Furca mede 1,5 mm de comprimento e é mais espessa na base
	<i>Paranota ensifera</i>	Fezes filiformes e dispostas como um leque atrás das exúvias.	Furca mede 1,5 mm de comprimento e é mais espessa na base.
Mesomphaliini	<i>Anacassis fuscata</i>	Composto por exúvias e fezes pastosas	Larva achatada dorso ventralmente, furca mede 1,6 mm de comprimento (Buzzi, 1994)
	<i>Anacassis languida</i>		

Tribo	Espécie	Observações sobre o escudo	Observações sobre a larva
Cassidini	<i>Chelymorpha cribaria</i>	Composto por exúvia e fezes	
	<i>Charidotis</i> sp.	Composto por exúvias e fezes pastosas	
	<i>Coptocycla adamantina</i>	Formado por massa fecal de forma irregular	
	<i>Gratiana</i> sp.1 sp. 2	Composto por exúvia e fezes	
	<i>Metriona elatior</i>	Composto por exúvia e fezes	
	<i>Plagiometriona flavescens</i>	Composto por exúvia e fezes	
	<i>Psalidonota contemta</i>		Furca mede 3,5 mm de comprimento
<i>Syngambria bisinuata</i>	Em larvas novas é composto por fezes filiformes e dispostas como um leque. Em larvas maduras é composto só por exúvia e é mais longo que o corpo da larva		

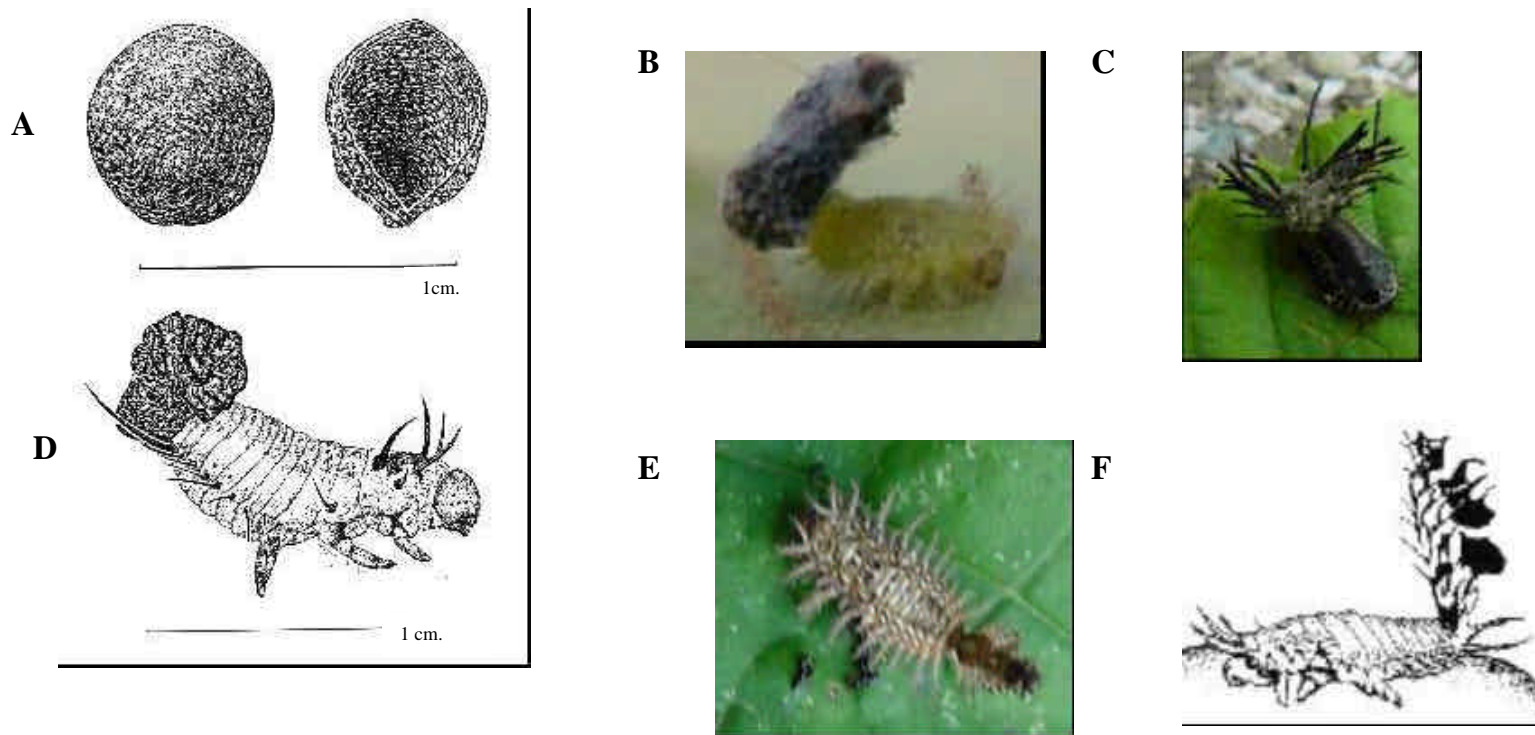


Figura 1.1. Aspecto do escudo de fezes de diferentes espécies de Cassidinae (Chrysomelidae). A. Vistas posterior e ventral, respectivamente, do escudo de *Stolas* sp. O escudo é formado por uma estrutura côncava onde a larva se insere completamente (desenho: Ângela Midori). B. Larva de *Gratiana spadicea* com escudo em forma de concha que cobre todo o corpo da larva (foto: Lenice Medeiros). C. Larva de Cassidinae não identificado com escudo formado por fezes filiformes (foto: Uwe Schulz). D. Larva de *Stolas areolata* e o escudo formado por uma massa de fezes e exúvia (desenho: Ângela Midori). E. Larva de *Cistudinella* sp. com o escudo formado só por exúvias (foto: Lenice Medeiros). F. Larva de *Deloyala guttata* com o escudo formado só por exúvias (desenho em Olmstead & Denno 1992).

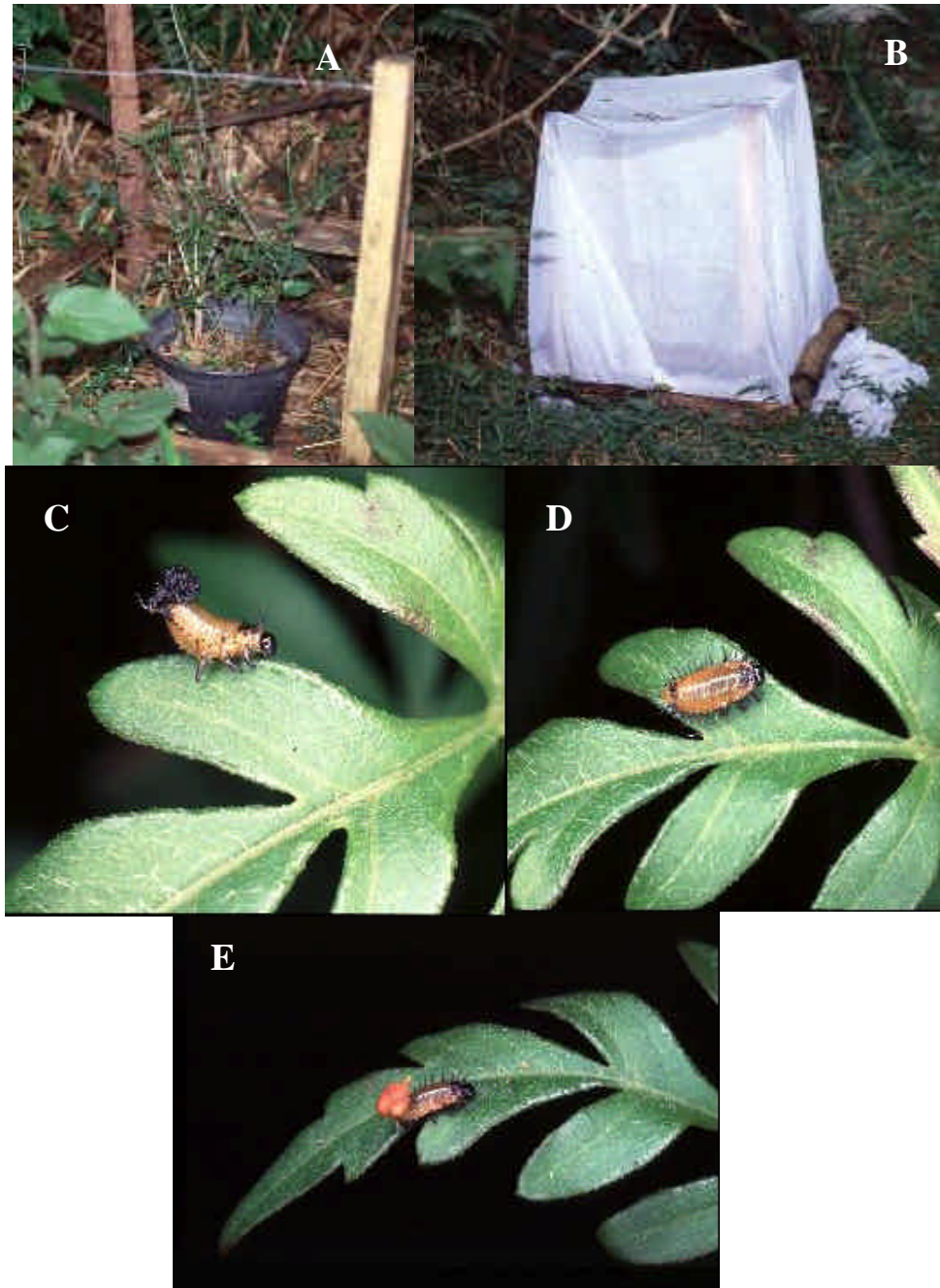


Figura 1.2. Aspecto de larvas e plantas submetidas a um experimento para se testar o papel de escudos em larvas de Cassidinae. A. Planta hospedeira sem proteção contra inimigos naturais colocada em trilha no campo (foto: José Roberto Trigo). B. Planta hospedeira com proteção contra inimigos naturais colocada em trilha no campo (note que os vasos são colocados dentro da mesma armação usada para proteger as plantas) (foto: José Roberto Trigo). C. Larva de *S. areolata* com o escudo natural (foto: Ricardo Sawaya). D. Larva de *S. areolata* com o escudo removido (foto: Ricardo Sawaya). E. Larva de *S. areolata* com o escudo natural substituído por um escudo artificial (foto: Ricardo Sawaya).

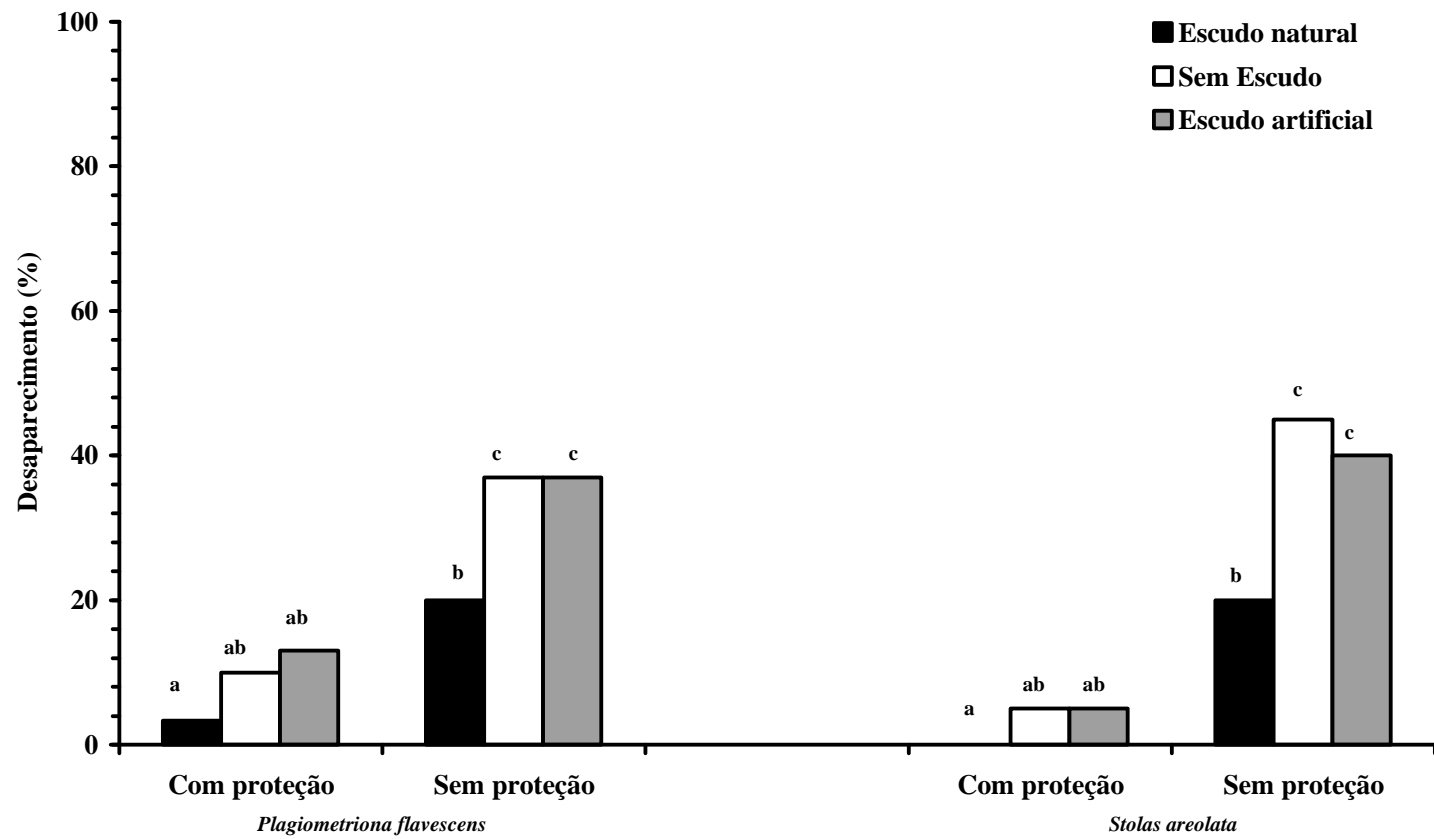


Figura 1.3. Desaparecimento de larvas de *Plagiometriona flavescens* e *Stolas areolata* submetidas a diferentes tratamentos no campo. Comparações foram feitas entre cada uma das espécies. Tamanho amostral para *Plagiometriona flavescens*: 30 para cada tratamento e para *Stolas areolata* 20. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%.

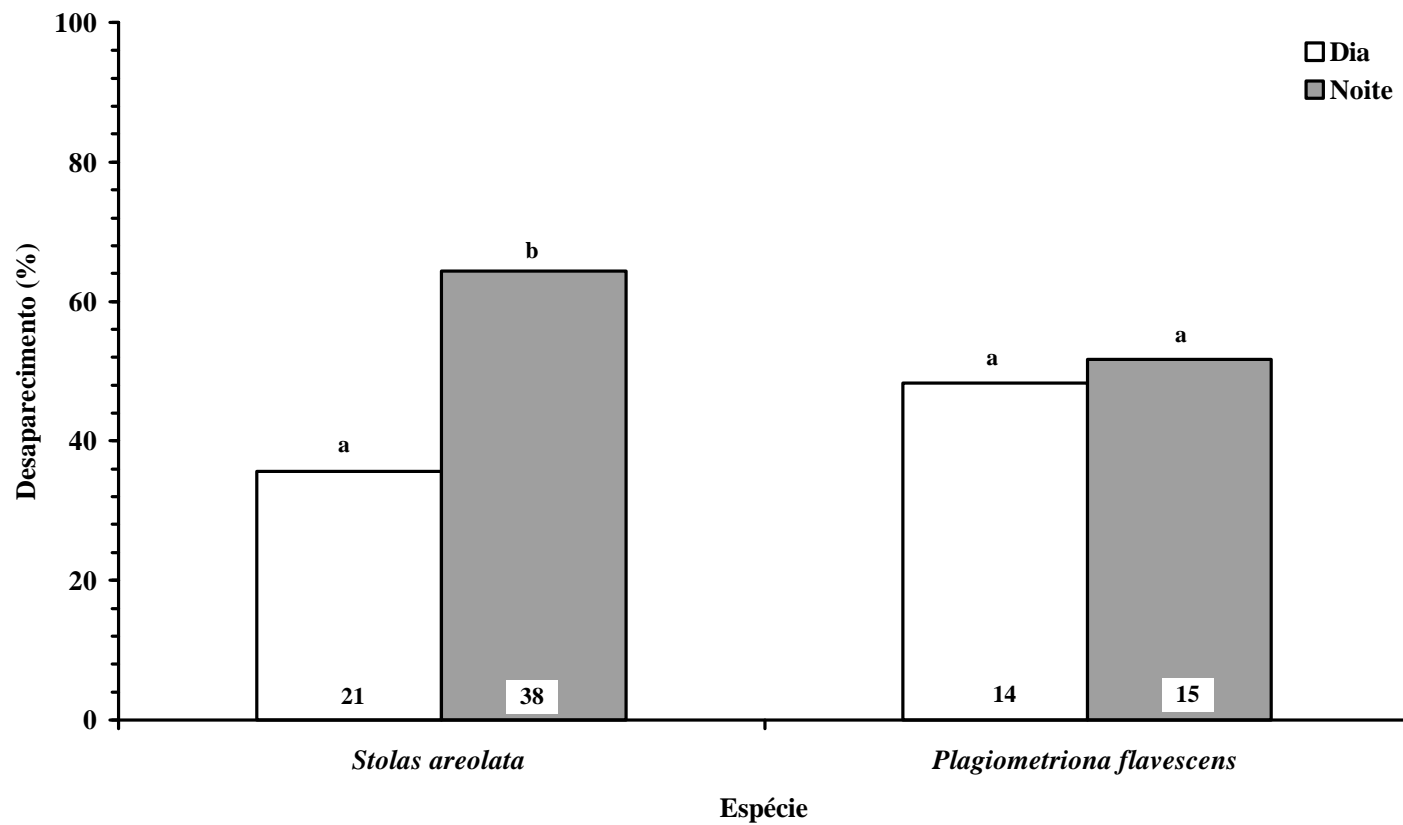


Figura 1.4. Padrão de ocorrência diurno e noturno de eventos de predação em *Stolas areolata* e *Plagiometriona flavescens* submetidos a experimentos de campo. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Comparações foram feitas entre cada uma das espécies. Letras diferentes indicam diferença significativa no nível de 5%.

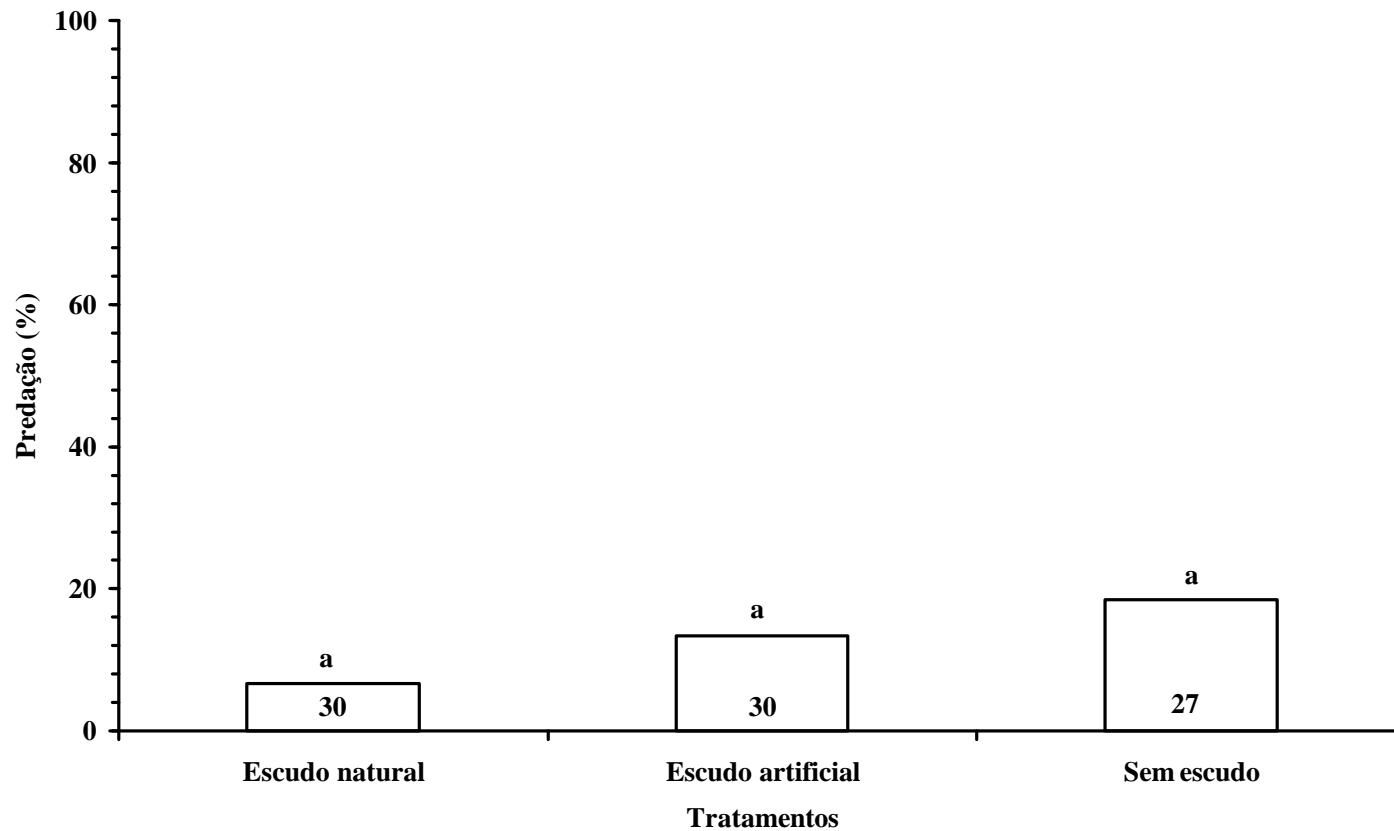


Figura 1.5. Predação em larvas de *Plagiometriona flavescens* oferecidas a ninhos da formiga *Camponotus crassus* durante bioensaios em laboratório. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras indicam a ausência de diferença significativa entre os tratamentos (nível 5%).

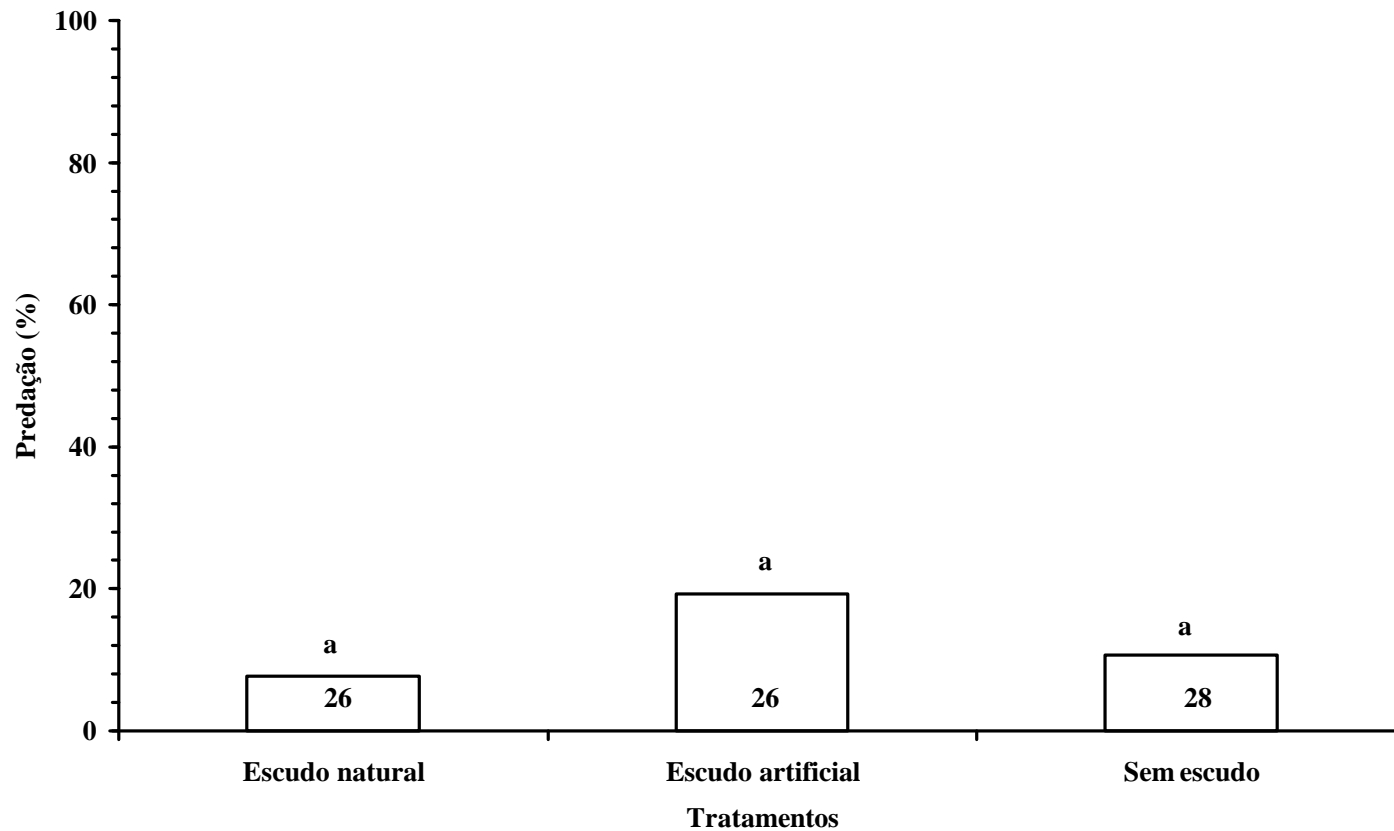


Figura 1.6. Predação em larvas de *Stolas areolata* oferecidas a ninhos da formiga *Camponotus crassus* durante bioensaios em laboratório. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras indicam a ausência de diferença significativa entre os tratamentos (nível 5%).

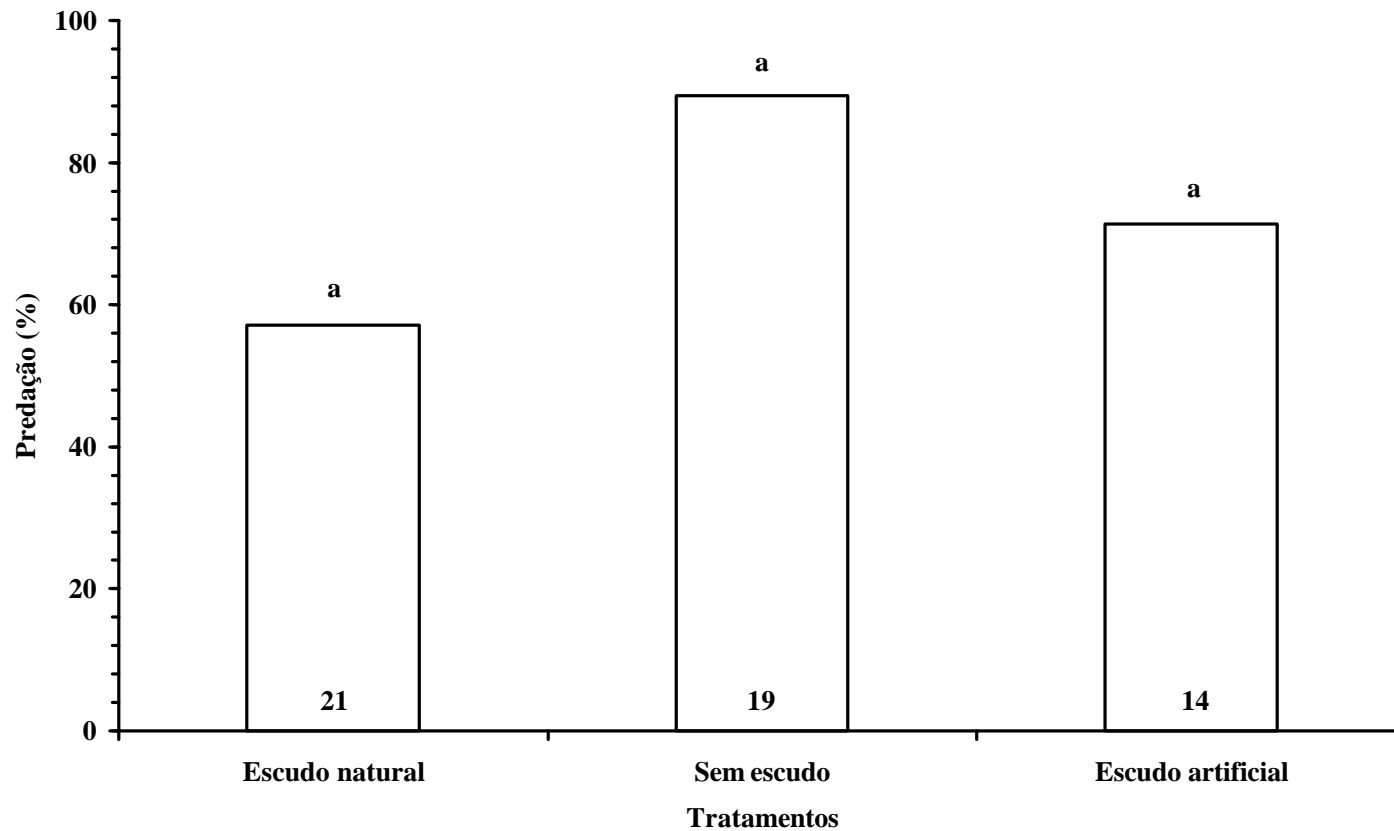


Figura 1.7. Predação em larvas de *Plagiometriona flavescens* oferecidas *Gallus gallus* jovens em bioensaios em laboratório. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras indicam a ausência de diferença significativa entre os tratamentos (nível 5%).

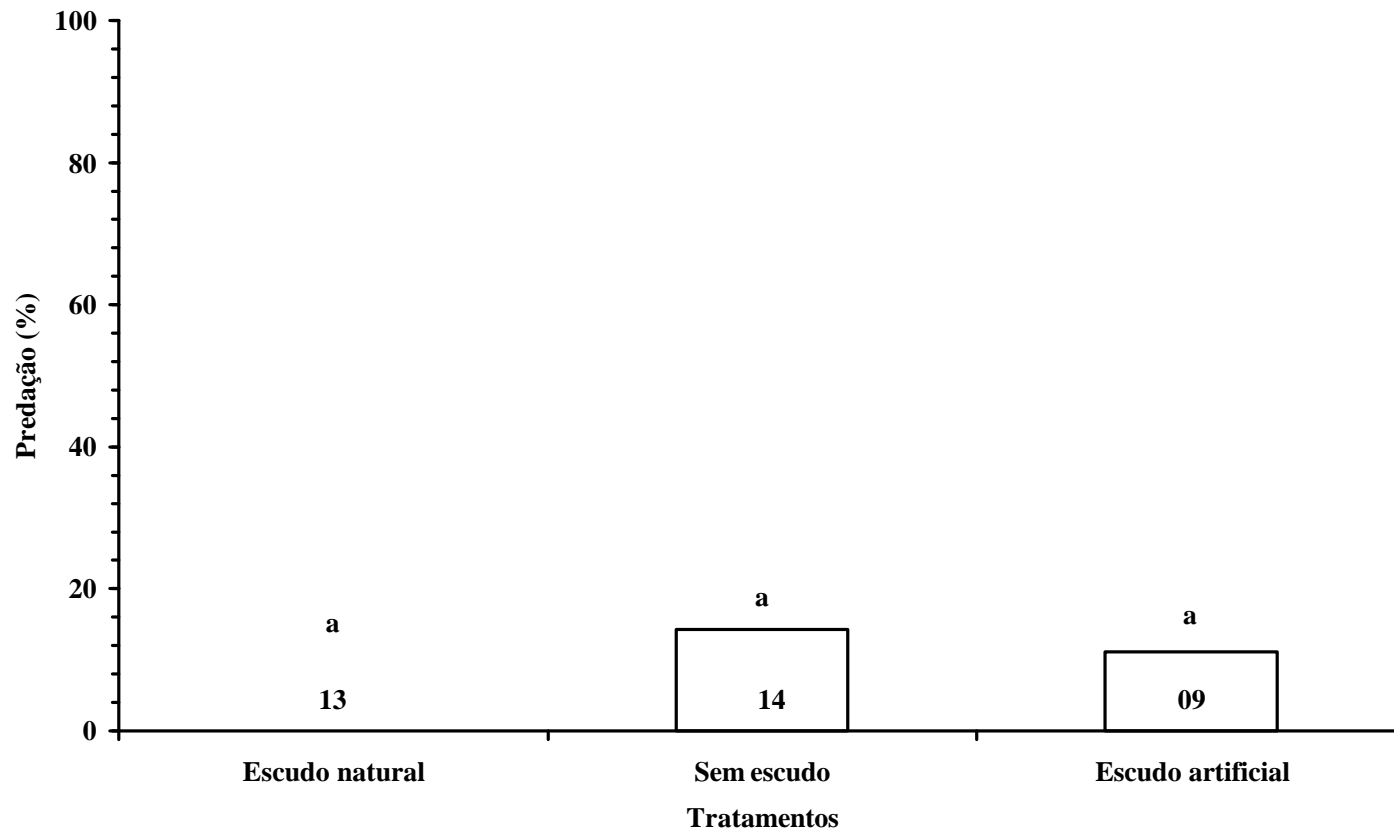


Figura 1.8. Predação em larvas de *Stolas areolata* oferecidas *Gallus gallus* jovens em bioensaios em laboratório. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras indicam a ausência de diferença significativa entre os tratamentos (nível 5%).

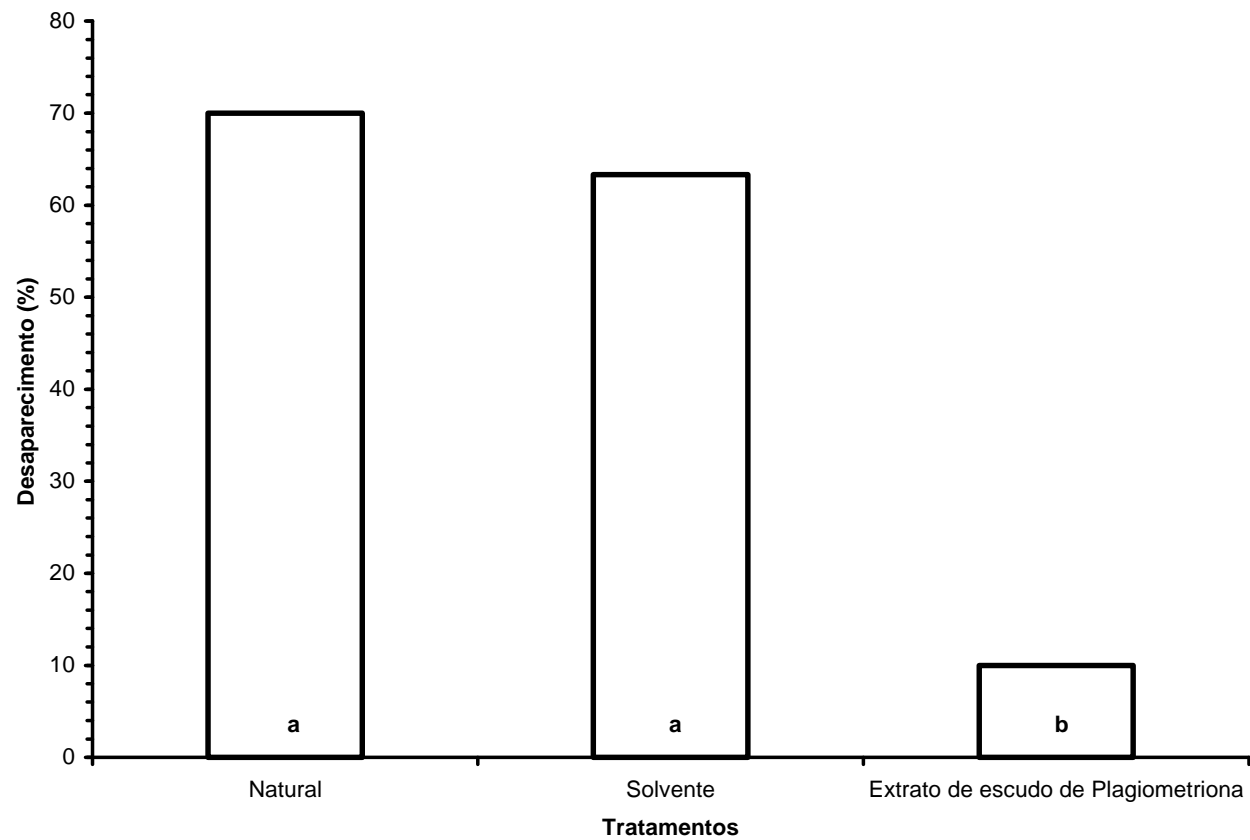


Figura 1.9. Percentagem de desaparecimento de larvas de *Spodoptera frugiperda* usadas como presas e submetidas a diferentes tratamentos no campo. Tamanho amostral: 30 para cada tratamento. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%.

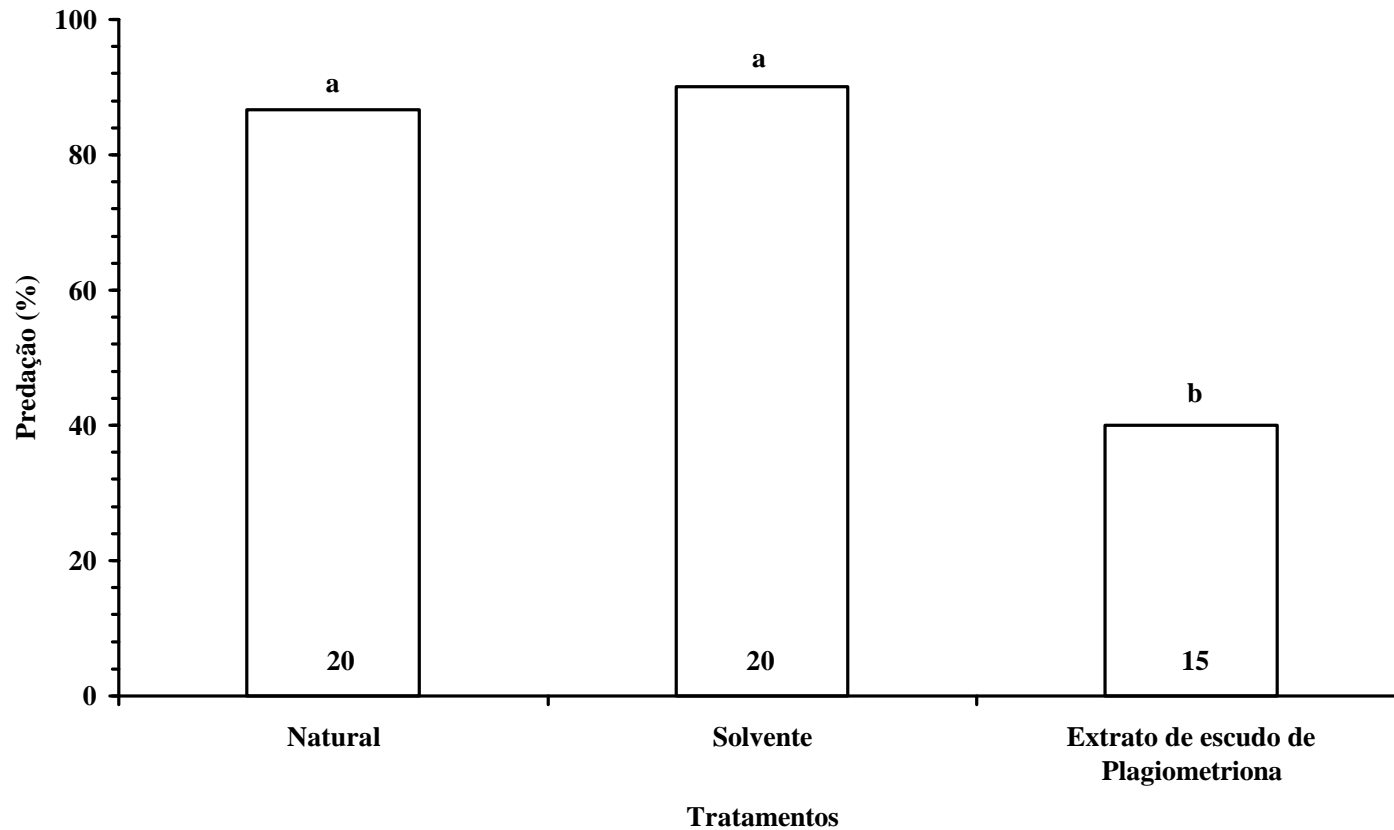


Figura 1.10. Percentagens de predação pela formiga *Camponotus crassus* em larvas de *Spodoptera frugiperda* usadas como presas e submetidas a diferentes tratamentos. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%.

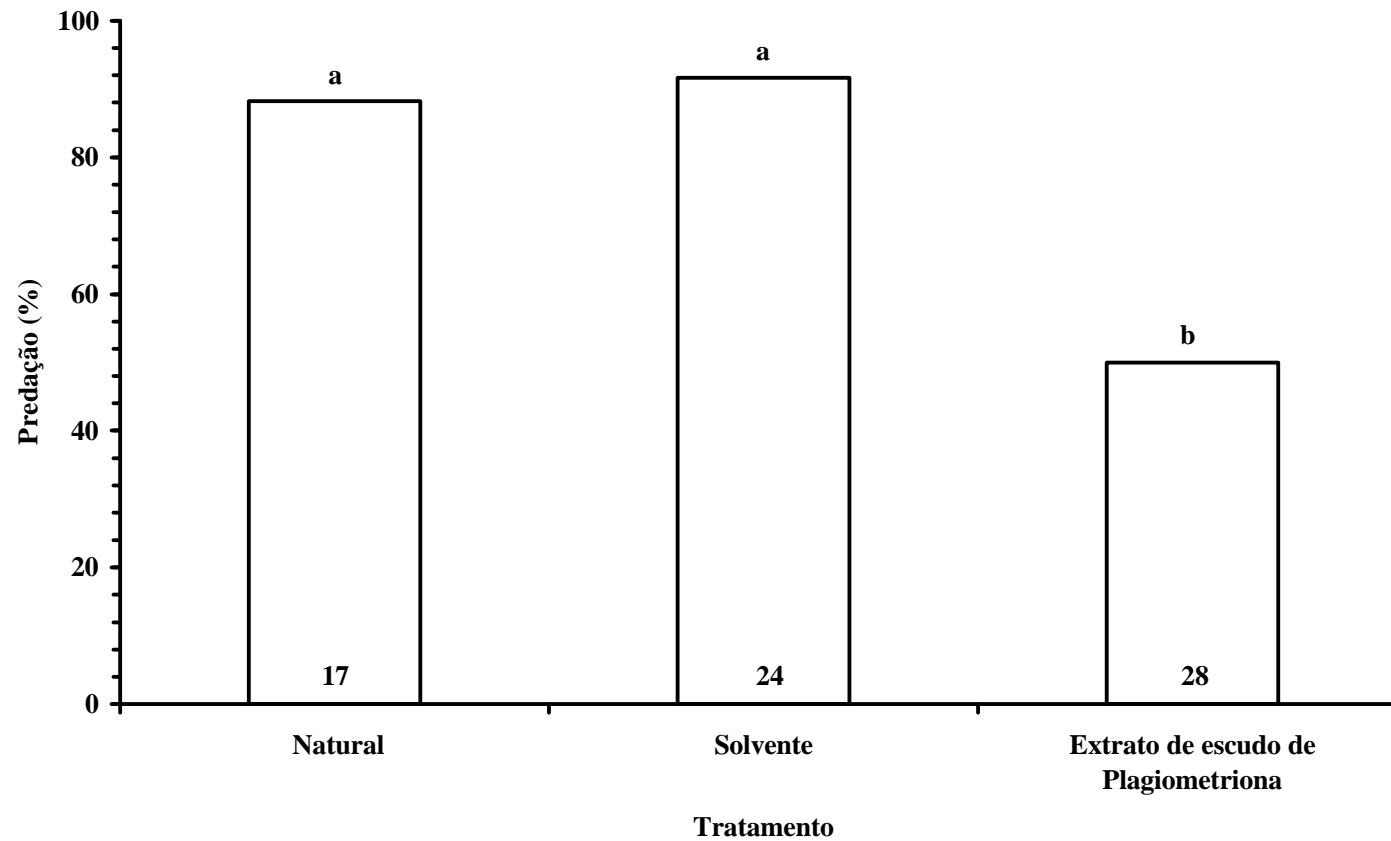


Figura 1.11. Percentagem de predação por *Gallus gallus* em larvas de *Spodoptera frugiperda* usadas como presas e submetidas a diferentes tratamentos no laboratório. Números dentro das barras indicam o tamanho das amostras. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%.

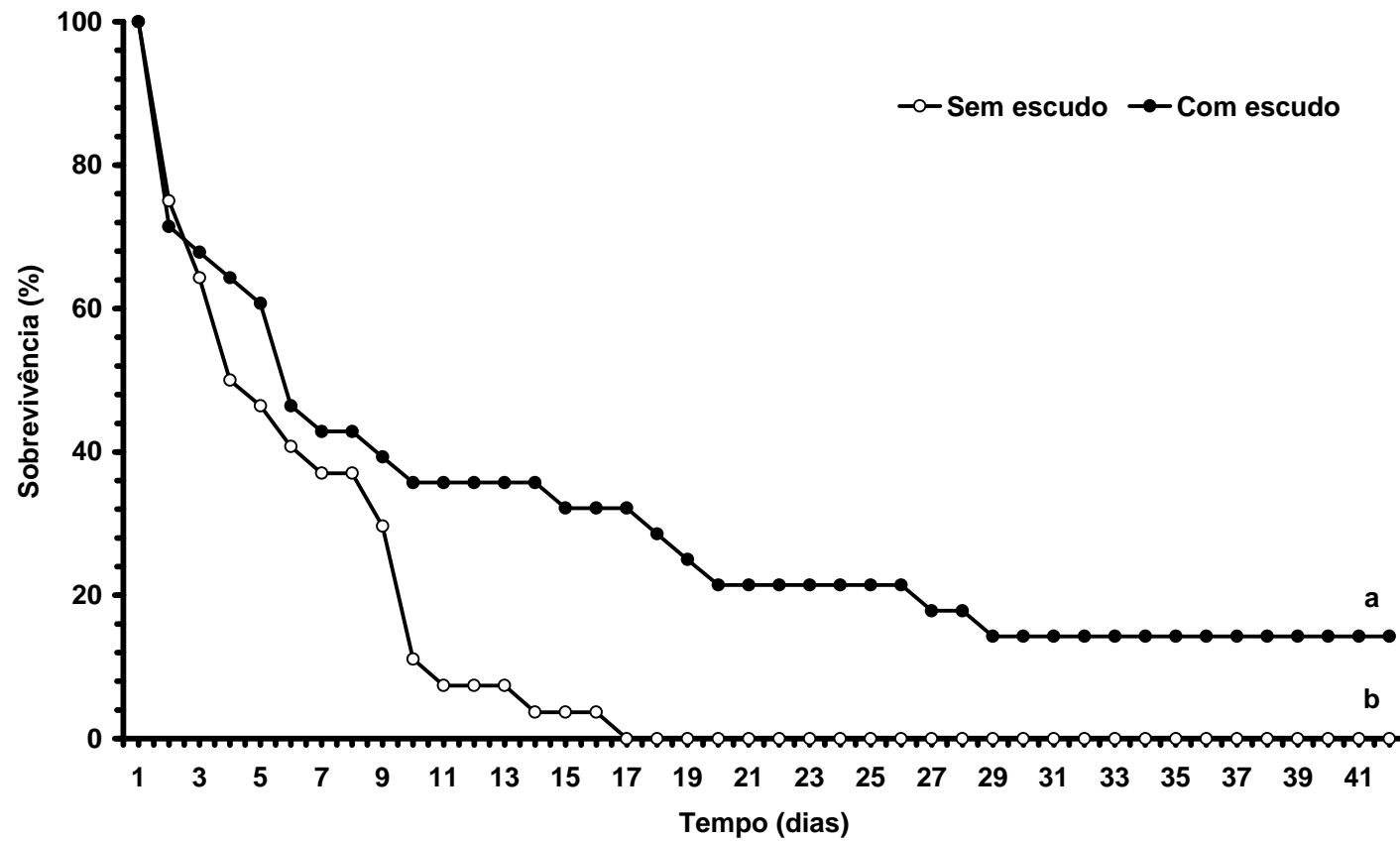


Figura 1.12. Curvas de sobrevivência de larvas de *Plagiometriona flavescens* acompanhadas no campo. Larvas foram mantidas com escudos intactos ou removidos. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%.

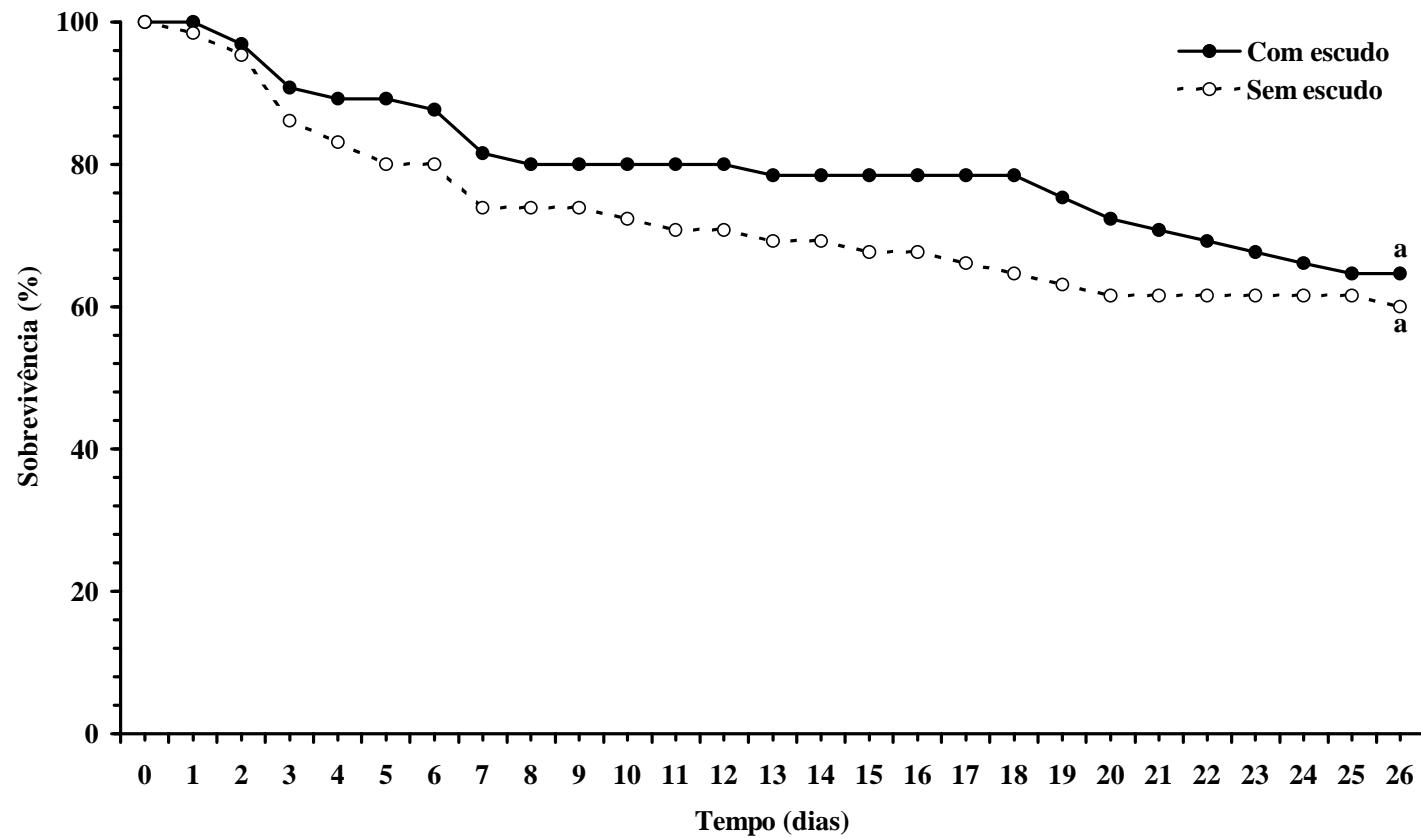


Figura 1.13. Curvas de sobrevivência de larvas de *Plagiometriona flavescens* acompanhadas no laboratório. Larvas foram criadas com escudos intactos ou removidos. Letras indicam ausência de diferença significativa (nível 5%).

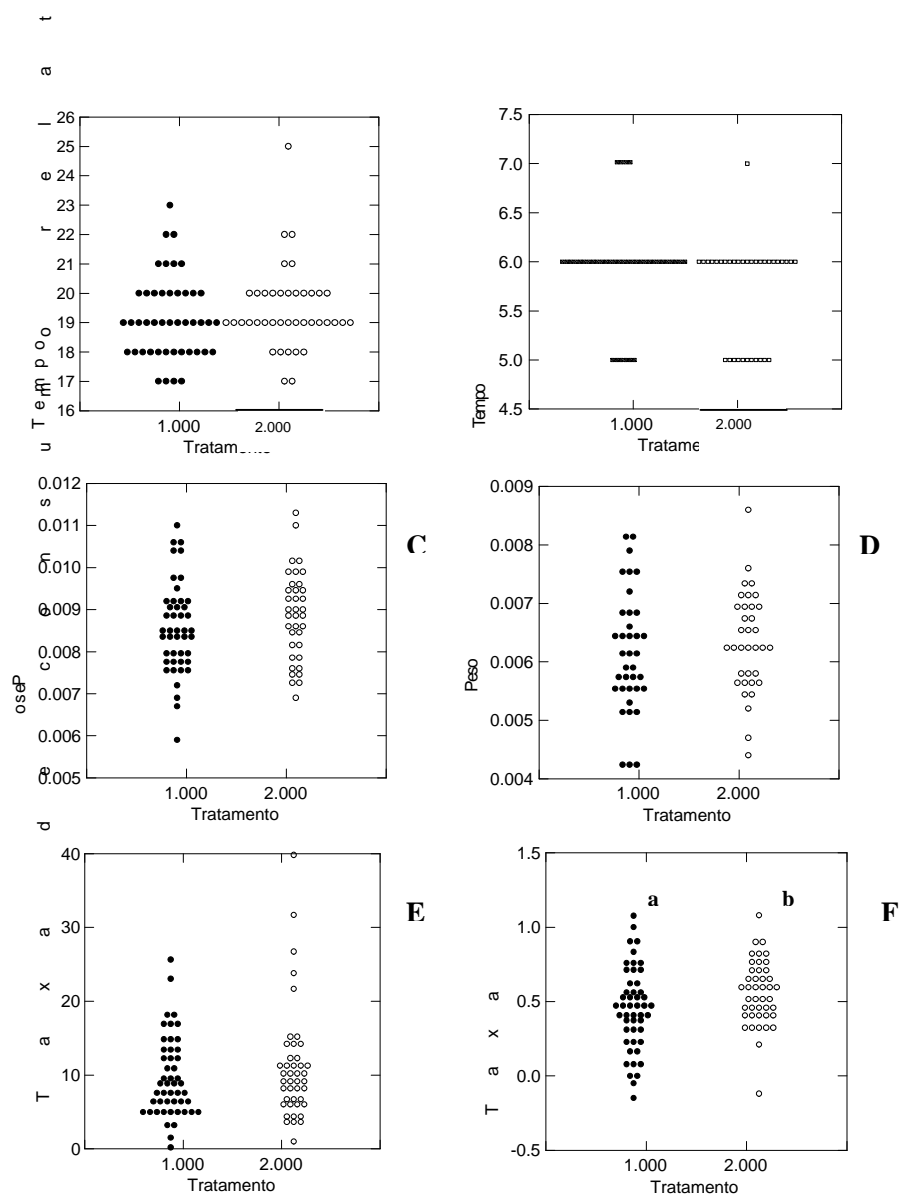


Figura 1.14. Desempenho de larvas de *Plagiometriona flavescens* submetidas a um experimento de laboratório para testar a influência da presença do escudo de fezes. Larvas foram acompanhadas com e sem o escudo e os parâmetros avaliados foram: A. tempo de desenvolvimento larval, B. tempo de desenvolvimento de pupa, C. peso de pupa, D. peso de adulto, E. taxa de consumo relativo, e F. taxa de crescimento relativo. 1 – escudo intacto, 2 - escudo removido. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%.

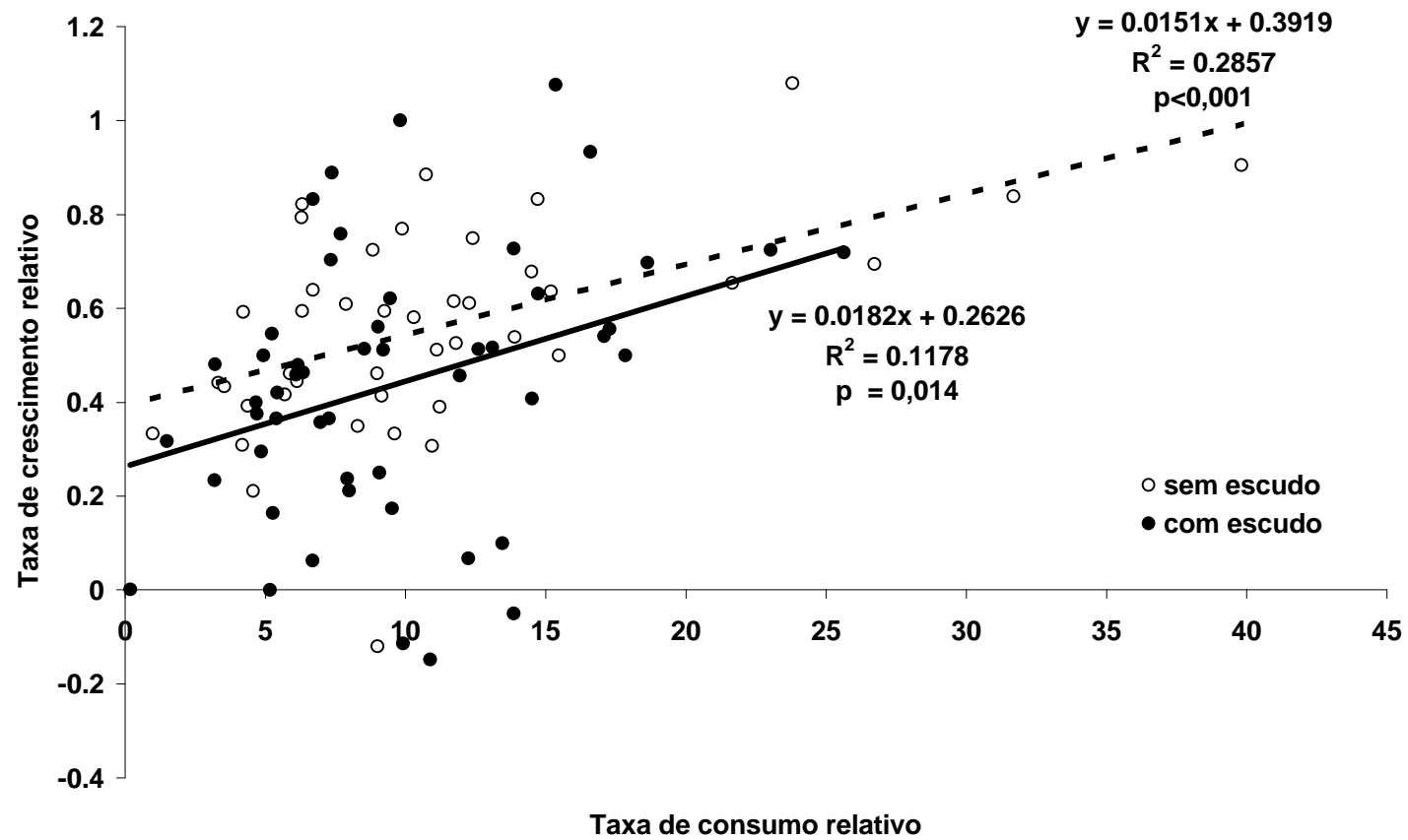


Figura 1.15. Regressão linear entre a taxa de consumo relativo e a taxa de crescimento relativo de larvas de quinto instar de *Plagiometriona flavescens* com ou sem escudos.

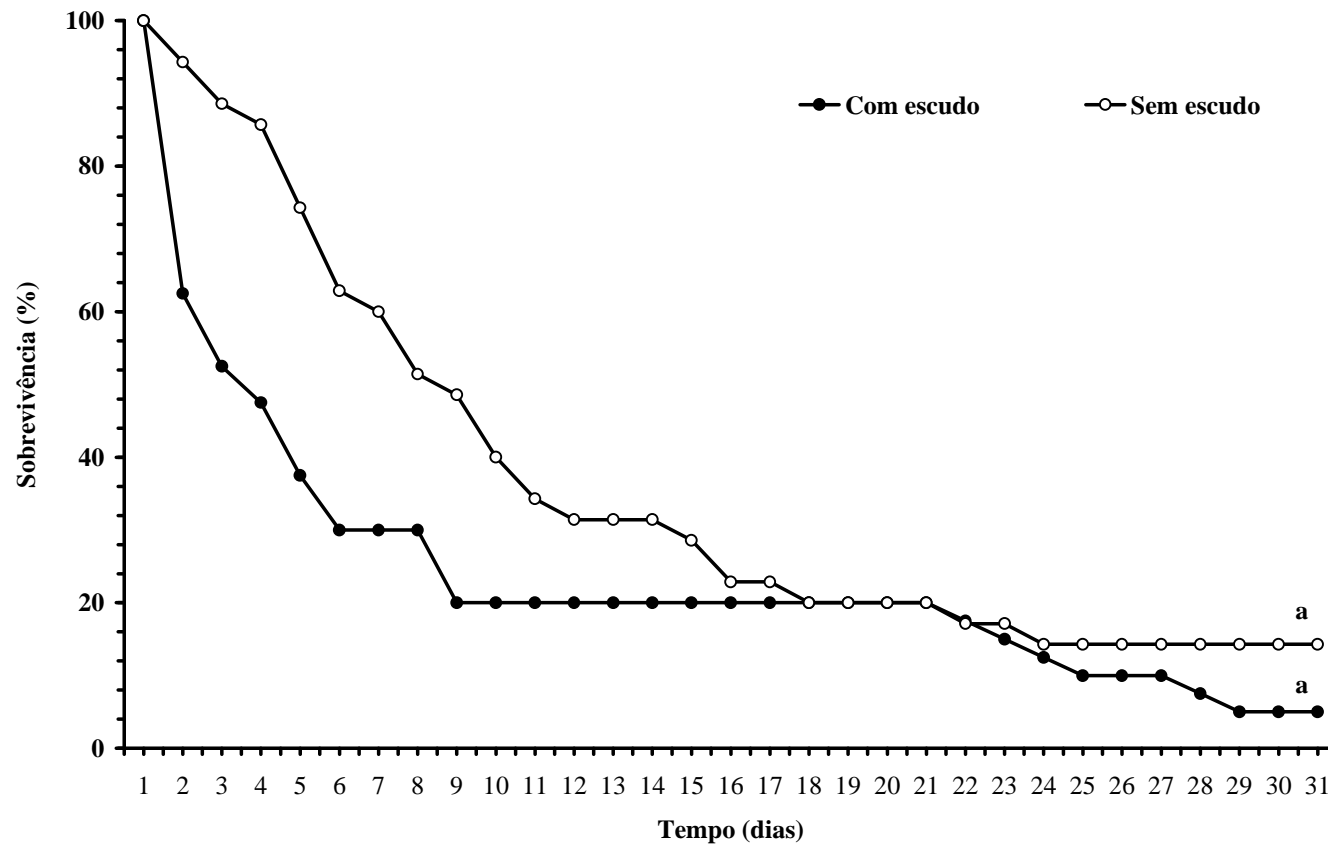


Figura 1.16. Curvas de sobrevivência de larvas de *Stolas areolata* acompanhadas no campo. Larvas foram mantidas com escudos intactos ou removidos. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%.

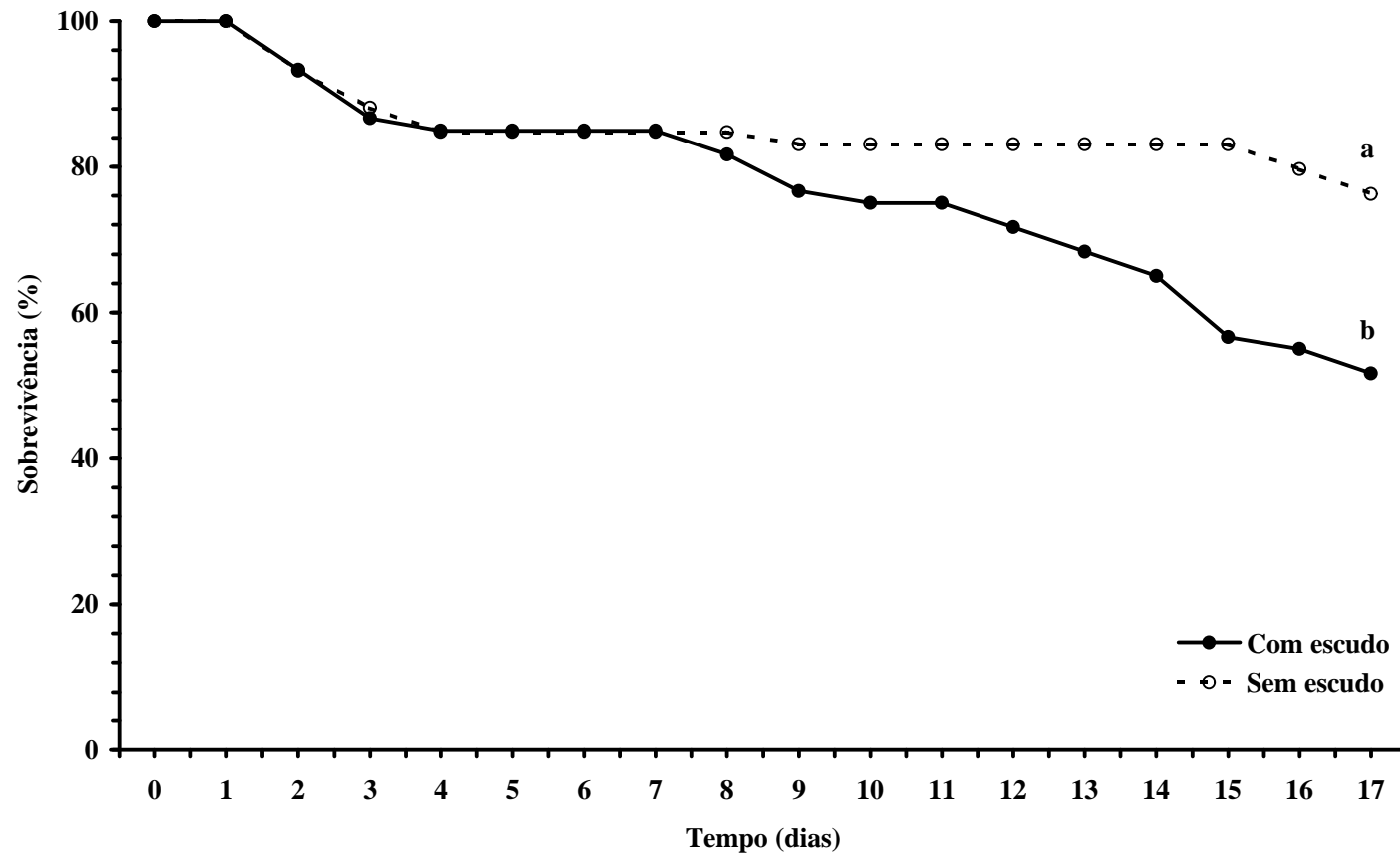


Figura 1.17. Curvas de sobrevivência de larvas de *Stolas areolata* acompanhadas no laboratório. Larvas foram criadas com escudos intactos ou removidos. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%.

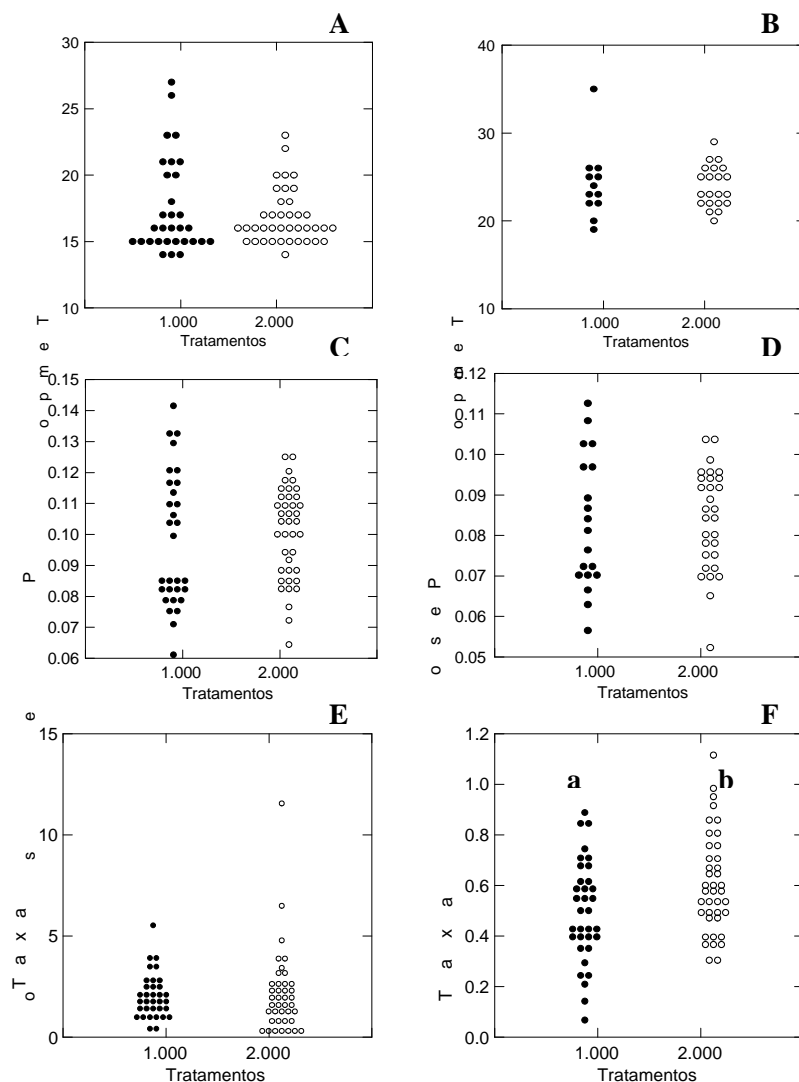


Figura 1.18. Desempenho de larvas de *Stolas areolata* submetidas a um experimento de laboratório para testar a influência da presença do escudo de fezes. Larvas foram acompanhadas com e sem o escudo e os parâmetros avaliados foram: A. tempo de desenvolvimento larval, B. tempo de desenvolvimento de pupa, C. peso de pupa, D. peso de adulto, E. taxa de consumo relativo, e F. taxa de crescimento relativo. 1 – escudo intacto, 2 - escudo removido. Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5%.

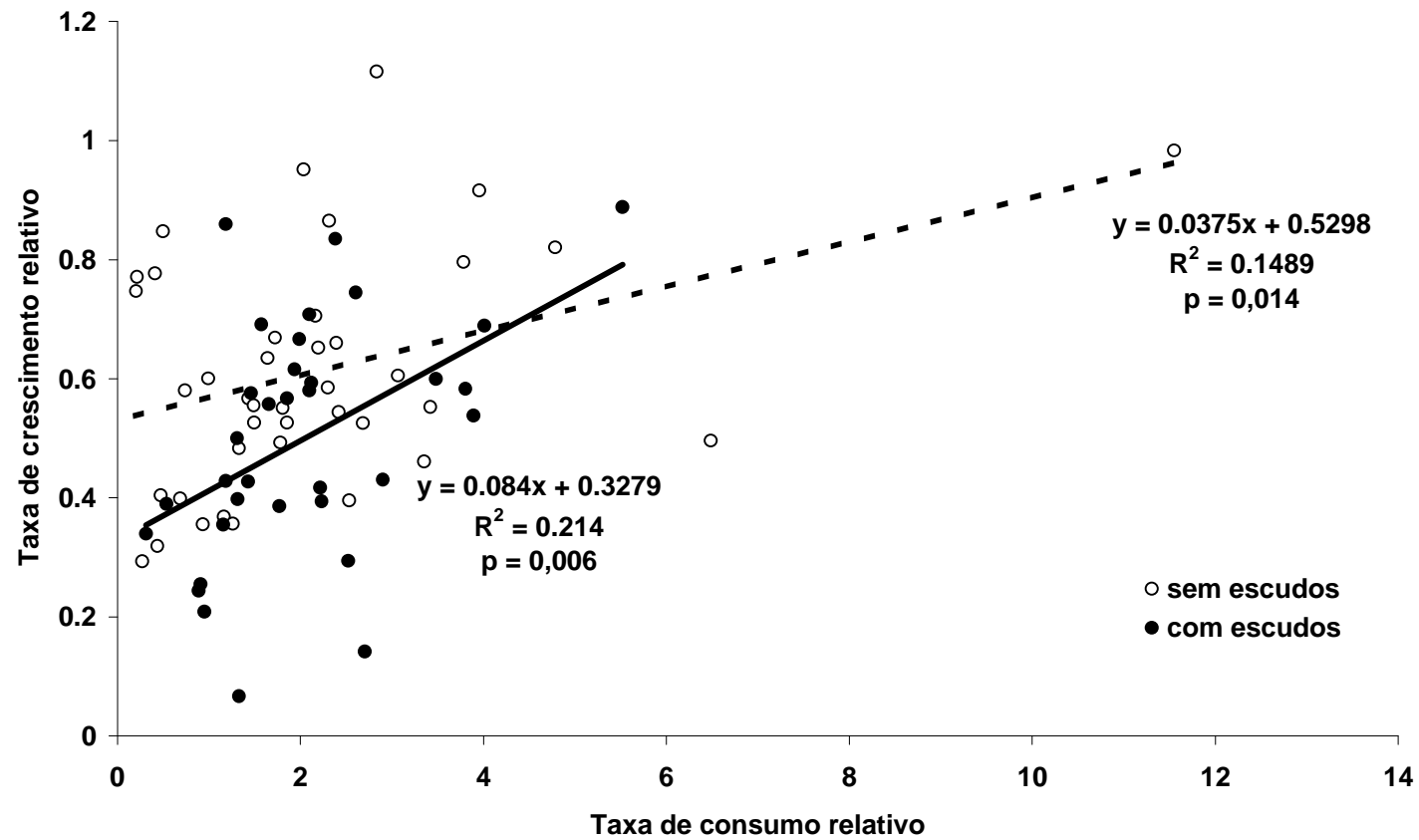


Figura 1.19. Regressão linear a taxa de consumo relativo e a taxa de crescimento relativo de larvas de quinto instar de *Stolas areolata* com ou sem escudos.

CAPÍTULO 2

Estratégias de defesas químicas de larvas de *Stolas areolata* e *Plagiometriona flavescens*

INTRODUÇÃO

Besouros da família Chrysomelidae utilizam substâncias químicas para sua proteção em todas as fases do desenvolvimento. Essas substâncias podem variar não somente entre diferentes espécies (mesmo que taxonomicamente próximas), como também entre as fases de desenvolvimento (Pasteels *et al.* 1988a; 1988b). Tal variação reflete uma notável diversidade de compostos utilizados, pertencentes a diferentes classes químicas (Pasteels *et al.* 1988a).

Esta diversidade de compostos, pode em parte ser explicada pela pressão dos diferentes inimigos naturais destes insetos (veja Introdução Geral desta tese) e da aprendizagem de predadores, levando ao desenvolvimento da diversidade de defesas químicas entre espécies simpátricas (Pasteels *et al.* 1988a) ou entre diferentes estágios de desenvolvimento. Os diferentes ambientes e modos de vida de larvas e adultos de insetos holometábolos (entre eles os Chrysomelidae) resultam em diferentes forças seletivas agindo sobre estes, em diferentes estágios de desenvolvimento (Bowers 1992). Este autor sugere, por exemplo, que, devido ao fato de larvas serem relativamente menos móveis do que adultos, estas provavelmente não poderiam usar as mesmas estratégias contra predadores que os adultos usam; por isso ser impalatável pode ser mais vantajoso para larvas.

Substâncias químicas defensivas de larvas e adultos de insetos têm duas origens principais, de acordo com a especialização e dependência dos insetos na química da planta hospedeira. Estas podem ser:

1. Autógenas: biossintetizadas pelo próprio inseto (pela síntese *de novo*, na qual o animal sintetiza substâncias presentes na sua planta hospedeira a partir de precursores de seu metabolismo primário), representando a ausência da dependência do inseto pela planta. Entre os crisomelídeos essas substâncias são produzidas por diferentes rotas biossintéticas (Pasteels *et al.* 1994).
2. Seqüestradas de suas fontes alimentares (Bowers 1992): representando uma dependência da planta hospedeira. O seqüestro por insetos herbívoros acontece quando os mesmos, ao invés de desintoxicar e/ou excretar os compostos secundários da planta hospedeira, os acumulam no corpo (Rowell-Rahier & Pasteels 1992). Crisomelídeos podem ainda apresentar uma dependência parcial da planta hospedeira, sintetizando seus compostos defensivos a partir de substâncias presentes na planta hospedeira.

Um outro tipo de utilização de compostos defensivos ocorre quando a espécie pode se defender tanto com substâncias autógenas quanto com substâncias seqüestradas. Alguns autores mencionam este tipo de estratégia como uma maneira do besouro reforçar a defesa por substâncias autógenas (Pasteels *et al.* 1988b; Blum 1994).

Substâncias seqüestradas não devem ser confundidas com aquelas que têm estado transitório pelo corpo do organismo. Todos os insetos que se alimentam de plantas tóxicas, certamente apresentam alguns compostos defensivos no seu sistema digestivo durante a alimentação (Blum 1994; Pasteels *et al.* 1994) que podem participar da sua defesa (Bowers 1992; Blum 1994; Pasteels *et al.* 1994), sem que estes sejam necessariamente seqüestrados. Segundo Pasteels *et al.* (1994), nesta situação transitória, apenas baixas quantidades dessas toxinas são encontradas.

É possível observar que muitas espécies de crisomelídeos são especializadas em plantas hospedeiras que contêm compostos secundários tóxicos e/ou impalatáveis tanto para

invertebrados quanto para vertebrados (Bowers 1992; Rowell-Rahier & Pasteels 1992; Blum 1994; Pasteels *et al.* 1996). Entretanto, pelo menos entre membros da subfamília Chrysomelinae, a defesa química parece ser primariamente autógena, e rara e secundariamente derivada da planta hospedeira (Pasteels & Rowell-Rahier 1991; Blum 1994; Pasteels *et al.* 1996; Pasteels *et al.* 2003). Todas as espécies já estudadas do gênero *Phratora*, por exemplo, biossintetizam monoterpenos ciclopentanóides, exceto *P. vitellinae* que utiliza salicina e glicosídeos fenólicos de sua planta hospedeira (Köpf *et al.* 1998). Espécies do gênero *Oreina* biossintetizam cardenolidas e seqüestram alcalóides pirrolizidínicos (Pasteels *et al.* 1994). A análise química da secreção de algumas espécies deste gênero apresentada por Pasteels *et al.* (1996) revelou três padrões diferentes: nove espécies que se alimentavam de Asteraceae ou Apiaceae secretam cardenolidas e uma espécie, *O. cacaliae*, seqüestrava somente alcalóides pirrolizidínicos da planta hospedeira. Outras três tinham um padrão misto, sendo capazes de secretarem cardenolidas autógenas e seqüestrarem alcalóides pirrolizidínicos, ou apresentarem somente uma dessas substâncias, como foi verificado para algumas populações.

Muitos autores acreditam que insetos fitófagos são majoritariamente especializados em suas plantas hospedeiras devido à composição química das mesmas, sendo limitados à utilização de espécies similares quimicamente (Erlich & Murphy 1988; Schultz 1988; Schoonhoven *et al.* 1998; Termonia *et al.* 2001). Desta forma, explica-se o seqüestro de substâncias tóxicas como o resultado da estreita relação dos insetos com suas plantas hospedeiras (Rowell-Rahier & Pasteels 1992). Existem exemplos de espécies que se especializaram em diversas plantas hospedeiras, similares quimicamente, tornando possível o seqüestro do mesmo composto consumindo diferentes espécies de plantas (Rowell-Rahier & Pasteels 1992; Termonia *et al.* 2001). Entretanto, esta não é a regra para todos os casos de seqüestro por insetos fitófagos e alguns autores sugerem que a dependência parcial de

compostos secundários das plantas ou a mistura de compostos autógenos e seqüestrados devem ter propiciado a vantagem dos insetos poderem se tornar mais flexíveis em relação à sua dieta e aumentar a amplitude de espécies de plantas hospedeiras utilizadas (Pasteels *et al.* 1996; Termonia *et al.* 2001). As espécies *O. speciosissima* e *O. elongata*, por exemplo, se defendem através de cardenolidas autógenas e alcalóides pirrolizidínicos seqüestrados. *Oreina speciosissima* se alimenta de *Adenostyles alliariae*, que apresenta alcalóides pirrolizidínicos e de *Petasites albus* (ambas Asteraceae), sem esses alcalóides (Pasteels *et al.* 1995). *Oreina elongata* se alimenta de *Adenostyles leucophylla*, que apresenta alcalóides pirrolizidínicos e de *Cirsium spinosissimum*, sem esses alcalóides (ambas Asteraceae) (Pasteels *et al.* 1995). Esses autores verificaram que populações dessas espécies foram encontradas exclusivamente produzindo cardenolidas, ou exclusivamente seqüestrando alcalóides, ou ainda fazendo ambos dependendo da disponibilidade local de suas plantas hospedeiras. Este exemplo demonstra a flexibilidade do uso de plantas e da defesa química de espécies que utilizam tanto substâncias seqüestradas quanto autógenas. Entretanto, deve ser enfatizado que, independente da população onde são encontradas, todas as espécies que seqüestram alcalóides pirrolizidínicos ainda são capazes de biossintetizar defesas autógenas. A única exceção é *O. cacaliae*, que abandonou a habilidade de biossintetizar cardenolidas (Pasteels *et al.* 2003).

Considerando essa variação da origem dos compostos químicos defensivos, alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de se comparar a eficiência de compostos autógenos e seqüestrados em proteger os organismos onde se encontram. Rowell-Rahier *et al.* (1995) ofereceram para o modelo de predador *Agelaius phoeniceus*, uma ave, adultos de duas espécies, que têm morfologias similares, *O. gloriosa* e *O. cacaliae*. Os autores verificaram que indivíduos de *O. cacaliae*, que seqüestram alcalóides pirrolizidínicos, foram mais rejeitados do que os de *O. gloriosa*, que não seqüestram nenhum tipo de composto e se protegem de

substâncias biossintetizadas. Resultado semelhante foi encontrado por Palokangas & Neuvonen (1992) quando compararam a frequência de larvas de *Phratora vitellinae* (que seqüestra salicina da planta hospedeira) e de *P. polaris* (que biossintetiza compostos defensivos) predadas por aranhas. Os autores verificaram que larvas de *P. vitellinae* foram significativamente menos comidas do que de *P. polaris*. Em outros experimentos, descritos em Pasteels *et al.* (1996), foram utilizados adultos de *O. elongata*, uma espécie que consome mais de uma espécie de planta hospedeira e que é capaz de seqüestrar alcalóides pirrolizidínicos quando presentes na planta hospedeira, ou de biossintetizar cardenolidas quando alcalóides pirrolizidínicos são ausentes. Os experimentos tiveram como objetivo verificar quais tipos de substâncias são recuperadas mais rapidamente após a perturbação do organismo e sua liberação. Foi verificado que a recuperação de alcalóides pirrolizidínicos é mais rápida do que a nova síntese de cardenolidas. Portanto, para Chrysomelinae, os trabalhos realizados até o momento demonstraram que seqüestrar substâncias defensivas da planta hospedeira seria mais eficiente do que biossintetizá-las.

Em uma consideração rápida, pode parecer energeticamente vantajoso e evolutivamente mais simples reciclar compostos defensivos da planta hospedeira do que biossintetizá-los (Blum 1994). Além disso, os resultados apresentados acima também sugerem a vantagem em se defender através de substâncias seqüestradas. Entretanto, as defesas autógenas são mais frequentes em Chrysomelinae porque existem limitações para se utilizar substâncias tóxicas e/ou deterrentes provenientes da planta hospedeira. Segundo Bowers (1992), o seqüestro de compostos defensivos requer um mecanismo bioquímico que permita a passagem de substâncias defensivas potenciais do sistema digestivo do inseto para as estruturas onde estas serão acumuladas. Desta forma, esse autor identifica três adaptações fisiológicas necessárias para a utilização de compostos defensivos:

1. Enzimas de desintoxicação não devem entrar em contato com a substância seqüestrada. Por exemplo, se a substância for um glicosídeo, esta deve estar protegida contra a ação de glicosidases. Para evitar o ataque enzimático, os compostos tóxicos devem ser estocados em tecidos ou órgãos onde as enzimas de desintoxicação não ocorram. Alternativamente, tais compostos devem ser complexados com moléculas de transporte, tornando-os resistentes a estas enzimas de desintoxicação para o transporte para fora do sistema digestivo.
2. Os compostos devem ser capazes de passar pelo sistema digestivo para alcançar a hemolinfa. Neste caso moléculas de transporte também podem ser necessárias. A hemolinfa pode ser capaz de estocar tais compostos e direcioná-los aos predadores potenciais através do sangramento reflexo ou de um dano causado pelo ataque.
3. Os tecidos e órgãos devem estar protegidos ou imunes aos efeitos dos compostos defensivos. Alguns insetos podem estocar os compostos em órgãos especializados, como acontece com substância biossintetizadas *de novo*, as quais geralmente são estocadas em reservatórios associados às glândulas.

Provavelmente, devido às limitações para o seqüestro de substâncias defensivas, todos os cenários mais aceitos para a evolução da defesa química no complexo *Oreina-Chrysolina* consideram que a produção autógena de cardenolidas seja ancestral, e o seqüestro de alcalóides pirrolizidínicos se desenvolveu posteriormente (Pasteels *et al.* 1996; Dobler *et al.* 1996; Pasteels *et al.* 2003). Segundo Pasteels *et al.* (1996) o único cenário improvável seria que a defesa autógena (produção de cardenolidas) fosse derivada do seqüestro de alcalóides pirrolizidínicos. O mesmo padrão se repete para toda a sub-tribo Chrysomelina, sendo que após o desenvolvimento do seqüestro de substâncias de plantas hospedeiras, os besouros também

passaram a ser capazes de utilizar somente tais substâncias seqüestradas como precursores do seu composto defensivo (Termonia *et al.* 2001).

Uma vez que uma determinada espécie utiliza substâncias químicas para sua proteção, é necessário que haja um mecanismo para que as mesmas entrem em contato com o inimigo natural e que seu papel seja desempenhado. Os compostos defensivos são estocados em diferentes órgãos e seu modo de liberação varia não só entre espécies mas também entre os estágios de desenvolvimento de uma mesma espécie (Pasteels *et al.* 1988b). A liberação das substâncias pode ocorrer à partir de glândulas exócrinas especializadas, por sangramento reflexo ou ainda através de fezes (Pasteels *et al.* 1988a; Rowell-Rahier & Pasteels 1992), como foi amplamente discutido no primeiro capítulo desta tese. Algumas espécies ainda podem regurgitar substâncias defensivas. Larvas de *Crioceris* sp. quando perturbadas regurgitam uma grande quantidade de fluído que algumas vezes cobre todo o seu corpo (Pasteels *et al.* 1988b). Substâncias recém ingeridas e que ainda estejam acumuladas no aparelho digestivo do inseto antes da sua digestão/seqüestro (em alguns casos) podem ser usadas com este propósito (J.M. Pasteels, com. pess.). Em alguns casos, é a ação mecânica dos predadores que causa a liberação das substâncias através do sangramento pelos cortes (Pasteels *et al.* 1988a; Rowell-Rahier & Pasteels 1992). Desta forma, as substâncias que estão estocadas na hemolinfa ou nos tecidos só são liberadas após o ataque; e por esta razão, o predador somente entra em contato com a mesma após danificar a presa. Mesmo se a presa não sobreviver, o predador pode aprender a evitar futuros contatos em outros indivíduos semelhantes (Pasteels *et al.* 1988a).

A maneira como a substância defensiva é liberada influencia na eficiência da proteção de cada classe de composto (Rowell-Rahier & Pasteels 1992). Como exemplos, Rowell-Rahier & Pasteels (1992) mencionam que voláteis irritantes devem ser mais eficientes quando liberados por glândulas que permitem que estes ajam mesmo se o predador estiver a uma

determinada distância, repelindo-o antes do contato com a presa. Outro exemplo mencionado por estes autores é o de compostos que atuam como deterrentes, ou que afetam processos fisiológicos do predador. Neste caso, tais compostos podem desempenhar sua função mesmo que sejam liberados somente após o ataque. Hilker (1994) mostrou que todos os compostos defensivos conhecidos de ovos de Chrysomelidae não são voláteis e portanto somente apresentam atividade após o contato ou ingestão pelo predador. Pasteels *et al.* (1984) mencionam que substâncias voláteis produzidas por larvas são eficientes em protegê-las contra artrópodos, enquanto que compostos associados ao aposematismo dos adultos são mais direcionados contra animais vertebrados de pequeno porte, como aves.

Apesar de glândulas exócrinas já terem sido detectadas nas subfamílias Criocerinae, Chrysomelinae, Galerucinae e Alticinae (Pasteels *et al.* 1988b), não é raro que substâncias defensivas provenientes de planta, ou seus metabólitos, sejam estocados na cutícula e/ou na hemolinfa dos Chrysomelidae (Rowell-Rahier & Pasteels 1992). Muitas vezes a própria coloração de advertência é dada pela substância defensiva presente na cutícula (Blum 1994). Além dos compostos defensivos, a cutícula dos insetos é formada por hidrocarbonetos, álcoois, ácidos graxos, ésteres, glicerídeos, esteróis, aldeídos e cetonas; sendo os hidrocarbonetos os principais componentes (Lockey 1988).

Hidrocarbonetos cuticulares (HCs) têm como principal função proteger os insetos contra estresses provocados pelo ambiente, evitando sua dessecação (Jacob & Hanssen 1986; Dubis *et al.* 1987; Lockey 1988; Golden *et al.* 1992; Singer 1998). Esses compostos também podem ser úteis como pistas para reconhecimento de parceiros (Dubis *et al.* 1987; Hemptinne *et al.* 1998; Singer 1998) e para o reconhecimento de indivíduos pertencentes a uma mesma colônia (Dubis *et al.*, 1987; Dettner & Liepert 1994; Singer 1998). Existem ainda casos de insetos de diferentes ordens que parasitam formigas, mimetizando-se quimicamente, por apresentarem

HCs semelhantes aos das hospedeiras. Desta forma, estes insetos se beneficiam da alimentação e proteção, provenientes do hábito social das formigas. Este tipo de interação foi observado entre a lagarta *Maculinea rebeli* e a formiga *Myrmica schenki* [que apresentam aproximadamente 60% de similaridade (Elmes *et al.* 2002)] (Akino *et al.* 1999), entre o sirfídeo *Microdon piperi* e *Camponotus modoc* (Howard *et al.* 1999) e entre o besouro *Myrmecaphodius excavaticollis* e *Solenopsis richteri* (Meer & Wojcik 1982). Segundo Elmes *et al.* (2002), cada espécie de lagarta do gênero *Maculinea*, tem seu hospedeiro específico, que é uma espécie de formiga do gênero *Myrmica*. Elmes *et al.* (2002) analisaram os padrões químicos da cutícula de cinco espécies de *Myrmica* e compararam com os padrões das lagartas miméticas do gênero *Maculinea*. Eles concluíram que os padrões qualitativos e quantitativos de HCs das espécies de *Myrmica* são suficientemente diferentes entre si para sustentar a especificidade da interação entre *Myrmica* e *Maculinea*. Este é um caso interessante em que as substâncias químicas presentes na cutícula do herbívoro, não só o protege contra o ataque das formigas, com também o transforma em um parasita ou predador do modelo (Dettner & Liepert 1994; Singer 1998). No caso das formigas *Myrmica* e das lagartas *Maculinea*, por exemplo, as lagartas ou se alimentam das larvas de formigas ou são alimentadas pelas operárias (Elmes *et al.* 1991).

Além de intermediarem a interação de parasitismo sobre formigas através do mimetismo químico, substâncias químicas também são capazes de proteger crisomelídeos contra predação, por os tornarem tóxicos ou impalatáveis. Hilker (1994) menciona a eficiência de substâncias químicas na proteção de ovos contra formigas, testada em vários bioensaios de laboratório. Devido ao tamanho pequeno e cutícula macia de larvas, Pasteels *et al.* (1984) e Blum (1994) afirmam que é importante que o predador seja repelido antes de provocar ferimentos nas larvas. Pasteels *et al.* (1984) mencionam o exemplo de monoterpenos voláteis, os quais eficientemente irritam os inimigos distantes, antes de atacarem as larvas. Outras substâncias como

salicilaldeídos, benzaldeídos da secreção de *Chrysomela vigintipunctata costella* e *Chrysomela confluens* e juglona da secreção de *Gastrophysa depressa*, repeliram formigas ou fizeram com que larvas fossem evitadas por estes predadores (Pasteels *et al* 1988b; Kearsley & Whitham 1992). Blum (1994) também menciona o exemplo de substâncias químicas presentes na cutícula de *Xanthogaleruca luteola* (Galerucinae) que parecem repelir as formigas quando atacam as larvas. Apesar de formigas terem sido utilizadas na maioria dos experimentos de laboratório, a defesa química de Chrysomelidae também já foi demonstrada baseando-se em outros predadores generalistas, como aranhas (Palokangas & Nevonen 1992) e aves (Hough-Goldstein *et al.*1993; Hilker & Köpf 1994; Rowell-Rahier *et al.* 1995).

Apesar de existirem diversas investigações sobre a ocorrência da defesa química de Chrysomelidae, identificação de compostos envolvidos e inimigos naturais atingidos, nenhuma destas foi realizada testando-se espécies de Cassidinae. Durante a realização dos experimentos descritos no capítulo anterior, verificamos que além das substâncias provenientes dos escudos de fezes, as larvas pareciam apresentar outras substâncias em seu corpo que poderiam participar da defesa contra os predadores testados no laboratório.

Desta forma, os objetivos deste capítulo foram: 1. verificar se substâncias presentes no corpo de larvas de *Stolas areolata* e *Plagiometriona flavescens* seriam capazes de protegê-las contra predação e 2. identificar contra quais grupos de predadores essas substâncias são efetivas. Mais especificamente, o objetivo com larvas de *P. flavescens* foi verificar se o não reconhecimento de por parte de formigas se explica pela camuflagem química das larvas. Com *S. areolata*, o objetivo específico foi testar o papel de substâncias presentes no corpo de larvas em protegê-las contra predadores.

Uma vez que a metodologia utilizada para testar a defesa química de cada uma das espécies e os resultados encontrados foram bastante diferentes, descreveremos ambos os itens do trabalho separadamente para *S. areolata* e *P. flavescens*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. *Stolas areolata*

1a. *Bioensaio no campo*

Para verificar se substâncias químicas presentes no corpo de larvas de *S. areolata* conferem proteção às mesmas, realizamos um experimento no campo, utilizando larvas congeladas de 3º instar da mariposa noctuídea *Spodoptera frugiperda* como iscas palatáveis para aplicação tópica das substâncias. Para o experimento, usamos indivíduos de *C. pinnatifida* provenientes de cultivo na casa de vegetação do Laboratório de Ecologia Química.

Para extrações das substâncias de *S. areolata* das larvas, inicialmente removemos seus escudos de fezes e, posteriormente, transferimos as larvas para uma mistura de CH₂Cl₂:H₂O 1:1, para extrair tanto substâncias com afinidade com a água (polares) quanto com afinidade com diclorometano (apolares e medianamente polares), usando a proporção de 10: 1 (volume:peso). Homogeneizamos as larvas em Politron por dois minutos, e em ultra-som por mais dois minutos. Deixamos a mistura descansando à 4°C até a completa separação das fases aquosa e diclorometânica (orgânica), filtramos as duas fases, e repetimos mais uma vez o procedimento de extração com o resíduo sólido. Separadas as fases orgânica e aquosa, lavamos cada uma das fases três vezes; a fase orgânica foi lavada com água e a fase aquosa foi lavada com diclorometano. Tratamos a fase orgânica com sulfato de sódio anidro para eliminar traços de

água e posteriormente reduzimos seu volume em rota-evaporador à 25°C. O extrato aquoso foi liofilizado.

Calculamos a quantidade de extrato a ser aplicado em *S. frugiperda* através da razão “peso médio do corpo da larva de *S. areolata* / peso médio do corpo da larva de *S. frugiperda*”, a qual era 5,94. Logo, o extrato proveniente de cada larva de *S. areolata* era suficiente para ser aplicado em 5,94 larvas de *S. frugiperda*.

Depois de reduzir os volumes de ambos os extratos, ressuspendemos o extrato aquoso em água e o extrato orgânico em diclorometano. Determinamos o volume final de cada extrato de forma que se aplicasse 30 µl do extrato em cada unidade experimental (cada larva de *S. frugiperda*).

Aplicamos as substâncias (extrato ou solvente) nas larvas com o auxílio de uma microseringa de 10µl poucas horas antes de iniciar o experimento. Terminada a aplicação, levamos as larvas imediatamente para o campo onde foram, coladas na superfície abaxial de folhas das plantas hospedeiras experimentais, de acordo com os tratamentos cada um dos dez tratamentos descritos abaixo:

- i. Larva tratada com o extrato aquoso de larvas de *S. areolata*.
- ii. Larva tratada com o extrato orgânico de larvas de *S. areolata*.
- iii. Larva tratada com água, solvente utilizado para ressuspender o extrato aquoso de larvas de *S. areolata* (tratamento controle do extrato aquoso).
- iv. Larva tratada com diclorometano, solvente utilizado para ressuspender o extrato orgânico de larvas de *S. areolata* (tratamento controle do extrato orgânico).
- v. Larva no estado natural, sem a aplicação de nenhuma substância.

No início de cada experimento, fizemos um sorteio para determinar os tratamentos para cada planta hospedeira experimental. Como no desenho experimental utilizado no experimento de campo descrito anteriormente (Capítulo 1, item 1), um mesmo indivíduo de planta nunca esteve submetido ao mesmo tratamento por mais de uma vez. Para obter 20 repetições de cada tratamento utilizamos 20 indivíduos de *C. pinnatifida*, que foram submetidos a cada tratamento em dez períodos experimentais de dois dias cada. Experimentos preliminares indicaram que o período de dois dias era suficiente para expor larvas aos predadores, garantindo a atividade do extrato e conservação das larvas. Realizamos este experimento durante os verões de 2002 e 2003, porque as populações de Cassidinae e seus predadores são abundantes nesta estação (Nogueira-de-Sá & Vasconcellos-Neto 2003a).

No final de cada período experimental verificamos se cada larva estava intacta, desaparecida ou tinha sofrido ataques (através de marcas de mordidas). Para a análise estatística, registramos larvas que desapareceram com o valor 1 (um) e larvas intactas e parcialmente atacadas com o valor 0 (zero). A comparação entre as proporções de larvas atacadas em cada tratamento foi realizada através do teste Q de Cochran como no Capítulo I.

1b. Bioensaio em laboratório

O procedimento para realizar bioensaios com *G. gallus* juvenis foi o mesmo descrito no Capítulo 1. Neste caso, as larvas experimentais consistiam de larvas de *S. frugiperda* congeladas e tratadas com:

- i. Extrato aquoso de larvas de *S. areolata*.
- ii. Extrato orgânico de larvas de *S. areolata*.
- iii. Água (controle do solvente do extrato aquoso).
- iv. Diclorometano (controle do solvente do extrato orgânico).

v. Nenhuma substância.

A metodologia de condução do experimento e as análises estatísticas foram as mesmas utilizadas no Capítulo 1.

2. *Plagiometriona flavescens*

2a. *Experimento utilizando larvas vivas*

Larvas utilizadas para o experimento a ser descrito à seguir foram obtidas da criação de laboratório (condições descritas na Introdução Geral desta tese).

As colônias de *C. crassus* foram mantidas no laboratório como descrito no Capítulo 1. Dois dias antes de realizar o experimento oferecemos à colônia uma larva controle (larva congelada de 4° ou 5° ínstar de *S. frugiperda*). Oferecíamos esta larva ao ninho colocando-a sobre uma folha da planta hospedeira de *P. flavescens*, *Aureliana fasciculata* (Solanaceae). A folha tinha o pecíolo imerso em um vidro 10 ml com água e tampado com algodão, para que se mantivesse fresca durante todo o experimento. Se após 48 horas a larva de *S. frugiperda* não tivesse sido consumida descartávamos o experimento; caso contrário o experimento prosseguia com a introdução da larva viva de 4° ou 5° instar de *P. flavescens* também colocada sobre uma folha de sua planta hospedeira, como acima.

Comparamos as frequências de larvas mortas e vivas usando o teste do qui quadrado, considerando como hipótese nula que as frequências de larvas mortas e vivas no final do experimento seria a mesma.

2b. *Similaridade química entre larvas e plantas hospedeiras*

A metodologia para a extração de lipídeos cuticulares foi modificada de Haverty *et al.* (1996) e Young & Schal (1997) e consistia em lavar 10 larvas em 1 ml de hexano puro

(SupraSolv, Merck, Alemanha) durante cinco minutos. Filtramos o extrato em Na₂SO₄ anidro, e o secamos em fluxo de N₂, recuperando o mesmo com 100µl de hexano. Para a extração da planta, lavamos 10 folhas frescas em 10 ml de hexano, e usamos o restante do procedimento similar ao das larvas.

Analizamos as substâncias extraídas por cromatografia gasosa-espectrometria de massas por impacto de elétrons usando o aparelho Hewlett Packard 6890[®] com coluna capilar de sílica fundida HP5-MS[®] (dimensões 30 m. X 250 µm. X 0,25 µm. com recheio de 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano, Hewlett Packard), acoplado a um detector seletivo de massa Hewlett Packard 5973[®]. Condições: temperatura de injeção 250°C; programa de temperatura: 3 min. à 70°C, de 70°C até 300°C à 10°C/min., 20 min. à 300°C; Hélio foi usado como gás carregador à 1 ml/min; energia de ionização de 70 eV. Todas as substâncias presentes nos extratos foram identificadas através dos seus padrões de fragmentação e índices de retenção (calculadas como em van den Dool & Kratz, 1963), como em Adams (1995). Calculamos a similaridade química entre larva e planta hospedeira usando o Índice de Morisita (Wolda 1981).

2c. *Bioensaio usando Spodoptera frugiperda em Aureliana fasciculata*

Para testar se formigas seriam capazes de encontrar presas e se estas apresentavam o mesmo padrão de hidrocarbonetos cuticulares (HCs) da epiderme da planta onde se encontravam, realizamos um experimento de dupla escolha usando larvas *S. frugiperda* como modelo de larva e *C. crassus* como o modelo de predador. Removemos os hidrocarbonetos cuticulares das larvas de *S. frugiperda* de terceiro instar, imergindo-as em hexano por 10 minutos, secando-as em N₂ e liofilizando-as. Estas larvas foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- i. Aplicação de 50µl do extrato hexânico de *A. fasciculata*, com a concentração de HCs equivalentes a dez larvas de quinto ínstar de *P. flavescens* (10x concentrada). Utilizamos uma concentração superior a encontrada na larva em situação natural para evitar as perdas que eventualmente pudessem ocorrer na aplicação da substância, assim como na absorção de HCs pela cutícula da larva de *S. frugiperda*.
- ii. Aplicação de 50µl do extrato hexânico de *A. fasciculata*, com a concentração de HCs equivalentes a cinco larvas de quinto ínstar de *P. flavescens* (5x concentrada).
- iii. Aplicação de 50µl de hexano somente.
- iv. Nenhuma substância aplicada.

Realizamos dois diferentes tipos de bioensaio: o experimental, para testar o comportamento das formigas frente à larvas com a aplicação do extrato de *A. fasciculata* cinco e 10 vezes concentrado; e o bioensaio controle, para testar o efeito do hexano no comportamento das formigas.

No bioensaio experimental colamos na superfície adaxial de uma folha de *A. fasciculata*, uma larva com a aplicação do extrato (cinco ou 10 vezes concentrado) e uma larva com hexano aplicado. O pecíolo da folha foi colocado em um vidro de 10 ml com água e tampado com algodão. Colocamos este sistema no centro da arena de alimentação de *C. crassus* e invertemos a posição das larvas tratadas com extrato e com solvente nas diferentes repetições do experimento, evitando o efeito da localização das presas pela sua posição na folha. Observamos o comportamento das formigas e depois que uma das larvas tivesse sido encontrada pela primeira vez pela(s) formiga(s), contamos o número de formigas em contato com cada uma das larvas no final de cada minuto, durante 30 minutos. Este registro representava a contagem do

número instantâneo de formigas em contato com cada larva no final de cada minuto e não a contagem cumulativa durante o minuto inteiro.

Calculamos o Índice de Recrutamento (IR) de formigas nos bioensaios experimentais, como a porcentagem de formigas em contato com a larva em que foi aplicado o extrato (LE) em relação com o total de formigas recrutadas tanto para LE quanto para as larvas em que foi aplicado hexano (LH): $IR = [LE / (LE + LH)] \times 100$

Nos bioensaios controle, o IR foi calculado como a porcentagem de formigas em contato com a larva em que foi aplicado hexano (LH) em relação com o total de formigas recrutadas tanto para LH quanto para as larvas em que não foi aplicado nenhuma substância (LN): $IR = [LH / (LH + LN)] \times 100$.

Comparamos os IRs de larvas com aplicação de extrato cinco vezes concentrado, com aplicação de extrato dez vezes concentrado e do controle através do teste Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

1. *Stolas areolata*

1a. *Experimento de campo*

Não encontramos diferença significativa no desaparecimento de larvas de *S. frugiperda* submetidas a cada um dos cinco tratamentos testados ($Q = 0,34$; g.l. = 4; $p = 0,99$, Figura 2.1).

1b. Bioensaio em laboratório

No bioensaio com *G. gallus*, verificamos que larvas de *S. frugiperda* tratadas com extrato orgânico foram significativamente menos predadas do que larvas submetidas aos demais tratamentos ($\chi^2 = 30,15$; $p < 0,001$; Figura 2.2).

2. Plagiometriona flavescens

2a. Experimento utilizando larvas vivas

Durante os bioensaios observamos que formigas caminhavam e antenavam sobre as larvas de *P. flavescens* e pareciam não notar a presença da presa. As larvas raramente foram predadas pelas formigas (somente 6,67%, $n = 30$), e a frequência daquelas que sobreviveram ao bioensaio foi significativamente maior do que as que morreram ($\chi^2 = 22,53$; $p < 0,001$; $n = 30$). Observamos também que *P. flavescens* se movimentou pouco durante os bioensaios, sendo que na maioria dos casos não houve mudança da posição das larvas na folha durante as 24 horas de bioensaio.

2b. Similaridade química entre larvas e plantas hospedeiras

Os extratos hexânicos das folhas de *A. fasciculata* e larvas de *P. flavescens* apresentavam principalmente n-alcanos alifáticos e ramificados, com um alto índice de similaridade entre eles (78%) (Tabela 2.1).

2c. Bioensaio usando *Spodoptera frugiperda* em *Aureliana fasciculata*

Larvas de *S. frugiperda* com a aplicação de extratos de HCs da folha (cinco vezes ou dez vezes concentrados) raramente foram contatadas pelas formigas (Figura 2.3). Encontramos diferenças significativas entre os IRs para larvas com os extratos cinco ou dez vezes concentrados e para o controle ($U = 15,18$; $p = 0,001$; $gl = 2$; $n = 8$).

DISCUSSÃO

Neste capítulo foi demonstrado pela primeira vez que larvas de Cassidinae se defendem utilizando substâncias químicas presentes em seu corpo. Até o momento, o papel dessas substâncias na defesa de larvas de Cassidinae só havia sido demonstrado para aquelas presentes nos escudos de fezes (por ex., Gómez *et al.* 1999; Vencl *et al.* 1999; capítulo 1 desta tese). Conforme foi discutido no Capítulo 1, apesar de ambas as espécies estudadas apresentarem escudos de fezes, concluímos que esta estrutura parece ser eficiente em proteger somente larvas de *P. flavescens*. Portanto, os exemplos de defesa química, apresentados neste capítulo, podem representar uma proteção alternativa contra predadores que são capazes de atacar as larvas independentemente de outras estratégias que as larvas utilizem, como a presença dos escudos no caso de *P. flavescens*.

I. *Stolas areolata*

Através dos bioensaios de laboratório utilizando *G. gallus* jovens como modelo de predador, foi possível verificar que substâncias presentes no extrato orgânico de larvas de *S. areolata* as tornam impalatáveis para esta ave. Em bioensaios semelhantes, porém oferecendo-se larvas vivas de *S. areolata* para *G. gallus*, verificamos que estas larvas eram rejeitadas por este predador independentemente da presença do escudo de fezes (veja capítulo 1). Resultado

semelhante foi encontrado oferecendo-se larvas vivas para formigas *Camponotus crassus* (veja capítulo 1): em comparação com larvas sem escudo, apesar de mais larvas com escudo terem sobrevivido ao bioensaio, verificamos que menos que 20% das presas foram consumidas pelas formigas. Os resultados dos bioensaios com larvas vivas sugeriram que os compostos defensivos mais eficientes em proteger as larvas estão no seu corpo e não no escudo de fezes. Através do presente trabalho, pudemos confirmar essa sugestão, mostrando que essas substâncias são as responsáveis por tornar larvas impalatáveis para os *G. gallus* jovens.

Entretanto, no caso de *S. areolata*, os resultados obtidos no experimento de campo não demonstraram que as substâncias químicas presentes no corpo de larvas são capazes de reduzir sua predação. Pelo fato das larvas de *S. frugiperda*, submetidas a todos os tratamentos colocados em plantas desprotegidas contra predadores, terem sido consumidas em frequências similares, pode-se concluir que as substâncias presentes em ambos os extratos (orgânico e aquoso) não são impalatáveis aos predadores do local onde foi realizado o experimento. Este resultado não corresponde ao que era esperado não só devido ao fato dos compostos presentes no extrato orgânico terem apresentado atividade contra predação por *G. gallus* jovens em bioensaios de laboratório, como também por características das larvas desta espécie, que são aposemáticas, e apresentam o comportamento de liberarem um líquido pela boca quando perturbadas. Esse regurgito provavelmente é constituído por substâncias provenientes da planta hospedeira, que ainda não foram digeridas, e é considerado um reflexo defensivo, não só em muitos Chrysomelidae, como também em outros insetos como gafanhotos e larvas de Lepidoptera (Pasteels *et al.* 1988b). Portanto, mesmo que *S. areolata* não seja capaz de biossintetizar ou seqüestrar substâncias defensivas, o fato de regurgitarem pode indicar que compostos impalatáveis presentes na planta hospedeira sejam capazes de proteger as larvas enquanto estiverem passando pelo corpo das mesmas (Bowers 1992; Blum 1994; Pasteels *et al.*

1994). Insetos impalatáveis freqüentemente exibem determinadas características para advertirem suas qualidades desagradáveis aos predadores (Bowers 1980; Schuler & Hesse 1985; Bowers 1992). Schuler & Hesse (1985) demonstraram que *G. gallus* apresenta ataque inibido e consome menos presas se estas têm coloração amarela e preta em comparação com presas verde. Desta maneira, é possível sugerir que a coloração amarela das larvas de *S. areolata* e a presença dos escudos de cor preta indiquem aposematismo aos predadores. Outras características de larvas e adultos de insetos impalatáveis e que são observadas em *S. areolata* são o hábito gregário e localização na superfície adaxial da folha da planta hospedeira (Bowers 1980). Durante os instares iniciais, as larvas de *S. areolata* apresentam o hábito gregário e entre o penúltimo e último instares de desenvolvimento, as larvas apresentam o comportamento de permanecer na superfície adaxial da folha (Nogueira-de-Sá & Vanconcellos-Neto 2003b).

O resultado inesperado do experimento de campo pode estar relacionado com a comunidade de predadores de larvas presentes no local, que são capazes de consumir as larvas, apesar da presença de substâncias defensivas. Algumas razões podem ser mencionadas para explicar por que substâncias impalatáveis não protegem as presas de um determinado local. A primeira, que foi demonstrada por Müller & Hilker (2003), Olmstead & Denno (1993) e em outros trabalhos citados no segundo artigo, é que um tipo particular de defesa não proporciona uma proteção completa contra toda a diversidade de predadores generalistas que ocorrem em sistemas naturais. No caso das defesas químicas, Pasteels & Rowell-Rahier (1991) mencionaram que a quantidade de compostos defensivos encontrados em um determinado besouro varia amplamente entre diferentes espécies e a toxicidade também varia de acordo com a natureza do alvo, explicando a razão pela qual determinados compostos podem ser eficientes contra um determinado predador, mas não contra outro. Tanto em Muller & Hilker (2003) quanto em Olmstead & Denno (1993) os autores verificaram em diversos exemplos com

Chrysomelidae que escudos de fezes de uma determinada espécie de besouro poderia ser uma eficiente proteção contra certos predadores, enquanto que outros predadores eram capazes de consumir a mesma espécie de larva, ignorando a presença do escudo. Segundo Olmstead (1996) estratégias de defesa não podem ser “melhoradas” de forma a serem eficientes contra uma maior variedade de predadores e reduzirem o impacto dos mesmos por três motivos: **1.** as defesas que são observadas em uma espécie são o resultado de um balanço de custos e benefícios (eficiência na proteção), **2.** a evolução das estratégias de defesa é limitada por características morfológicas, ecológicas e genéticas da espécie, e **3.** predadores podem se adaptar às defesas, tornando-as inúteis. Em alguns casos, predadores utilizam a experiência de um contato prévio com a presa e passam a usar seus compostos defensivos como pistas químicas. O caso do sirfídeo *Parasyrphus nigratarsis* que é atraído por voláteis das secreções de suas presas, *Phratora vitellinae* e *Linnaeidea aenea* (ambos Chrysomelidae), é um exemplo desta situação (Köpf *et al.* 1997)

A segunda razão pela qual substâncias impalatáveis podem não proteger as larvas é a variação temporal do risco de ataque. Segundo Root & Messina (1983) e Olmstead & Denno (1993), durante a menor oferta de presas os predadores são mais insistentes no seu ataque e menos detidos pelas defesas da presa. Considerando que os experimentos foram realizados no verão, época de maior abundância de insetos, essa razão é menos provável. Entretanto, como não conhecemos completamente os predadores de *S. areolata*, essa hipótese não deve ser descartada.

Portanto, o que pode ser sugerido é que larvas de *S. areolata* apresentam substâncias impalatáveis, como demonstrado nos bioensaios com *G. gallus*, entretanto tais substâncias não são eficientes contra a comunidade de predadores presentes no Parque Estadual Intervales (área de estudo), que parece ser constituída principalmente por aracnídeos, como foi mencionado no

capítulo 1. Devido aos resultados dos bioensaios no laboratório usando *G. gallus*, seria esperado que, se aves insetívoras fossem abundantes no local, estas exerceriam uma pressão forte contra larvas e o resultado do experimento poderia ser diferente. Provavelmente neste local outros grupos de predadores, que não aves, são mais influentes, e outras estratégias, como o gregarismo, podem funcionar mais efetivamente.

Um outro aspecto importante e que não foi possível ser testado através do experimento de campo, era verificar se as substâncias presentes nas larvas têm outras funções, além da proteção contra predadores. Pasteels *et al.* (1988b) chamam a atenção que a maioria dos trabalhos sobre o papel dos compostos defensivos enfatizam somente predadores como os inimigos naturais alvos dessas substâncias. Esses autores citam o exemplo da proteção contra parasitóides e microorganismos (como bactérias e fungos), pois não se sabe se tais substâncias também apresentam atividade contra esses organismos. Raupp *et al.* (1986), Hilker (1989) e Schindek & Hilker (1996) verificaram que as secreções de quatro espécies de Chrysomelinae eram capazes de reduzir a alimentação e oviposição de conspecíficos ou de outros herbívoros que utilizavam a mesma planta hospedeira. Portanto, no presente trabalho não foi possível concluir se os compostos químicos de *S. areolata* teriam algum papel para as larvas, que não fosse protegê-las contra predadores.

2. *Plagiometriona flavescens*

P. flavescens apresentou uma estratégia de defesa utilizando seus HCs cuticulares. Dettner & Liepert (1994) em sua revisão sobre camuflagem química, apresentaram alguns exemplos de estratégias utilizadas por organismos para aumentar o acesso a alimento, parceiros sexuais e outros recursos importantes, muitas vezes através de HCs. Entretanto, a função defensiva de hidrocarbonetos não é comum. Espelie *et al.* (1991) sugeriram que a similaridade

química entre insetos herbívoros e suas plantas poderiam funcionar como uma estratégia defensiva contra predadores e parasitóides, e que compostos constituintes da cutícula seriam responsáveis por esta proteção. Portugal (2001) verificou que larvas da borboleta *Mechanitis polymnia* apresentam o seu padrão de HCs cuticulares similar ao da sua planta hospedeira, *Solanum tabacifolium*, sendo camufladas quimicamente contra formigas.

Neste capítulo o comportamento de *C. crassus* e a similaridade química de larvas de *P. flavescens* com sua planta hospedeira comprovaram a sugestão de Espelie *et al.* (1991). Os resultados apresentados demonstraram que além de imaturos de Lepidoptera, larvas de uma ordem diferente de insetos, Coleoptera, também podem se defender de predadores através da similaridade química com a planta hospedeira.

Considerando que a comunicação entre formigas é bastante específica (Hölldobler & Wilson 1990), pode-se sugerir que a estratégia apresentada pelos organismos capazes de se esconder quimicamente de formigas seja bem desenvolvida. Entretanto, se formigas são sensíveis o bastante para discernir diferenças relativamente pequenas na configuração de uma molécula (Hölldobler & Wilson 1990), poderia se esperar que apesar da similaridade da composição cuticular das larvas e folhas ser relativamente alta, as pequenas diferenças na composição de HCs poderiam ser reconhecidas por *C. crassus*. No entanto, sabe-se que a especificidade e precisão da comunicação entre formigas ocorrem devido à utilização de misturas de feromônios, e em muitos casos já foi verificado que somente um ou alguns componentes da mistura funcionam como o estímulo chave, iniciando a resposta, enquanto que os demais componentes têm a função de acrescentar especificidade à comunicação (Hölldobler & Wilson 1990). Desta forma é possível que a proteção de larvas de *P. flavescens* seja devido à presença de determinados compostos que não permitem o reconhecimento da presa pela formiga, ao invés da composição total de sua cutícula. Como não se conhece o mecanismo

fisiológico do reconhecimento químico das formigas, não é possível concluir se a alta similaridade entre larvas e folhas da planta hospedeira seja mais importante do que a presença de determinados compostos.

Como foi verificado no capítulo anterior, larvas de *P. flavescens* também apresentam o escudo de fezes, o qual pode ter importância para a defesa da larva contra predadores. Entretanto, conforme também foi discutido no capítulo anterior e por Olmstead & Denno (1993), o escudo não representa uma defesa completa contra inimigos naturais já que para alguns dos mesmos esta não representa uma barreira eficiente. Portanto, o mimetismo químico representa uma estratégia complementar utilizada por larvas contra predadores quimicamente orientados, como as formigas, importantes inimigos naturais de Chrysomelidae (Pasteels *et al.* 1988b; Olmstead 1996).

De acordo com Portugal (2001) esta estratégia de defesa através de HCs pode ser considerada tanto mimetismo quanto camuflagem, dependendo do conceito considerado. Entretanto, no caso do sistema *Aureliana – Plagiometriona - Camponotus*, o conceito de Endler (1981) de Batesismo é o que melhor define a situação estudada. Desta forma, a ineficiência de *C. crassus* em reconhecer as larvas de *P. flavescens* depende da similaridade a um objeto específico ou a uma espécie, no caso a composição química das folhas da planta hospedeira. Esse erro por parte das formigas influencia a dinâmica populacional e/ou evolução do modelo (a planta) porque se as larvas não são predadas, o consumo de folhas aumenta, afetando a aptidão da planta.

O comportamento de *P. flavescens* também é um aspecto importante que favorece o Batesismo: as larvas apresentam pouca movimentação, o que evita que sejam encontradas pelas formigas. Sendo esta uma característica da espécie, surge a necessidade de se investigar a

origem de tais HCs na larva. Considerando que *P. flavescens* consome diversas espécies de Solanaceae (Buzzi 1988; Nogueira-de-Sá & Macêdo 1998) e se caso os HCs sejam obtidos da planta hospedeira (seqüestradas), seria interessante investigar também se as larvas apresentam tal estratégia em qualquer espécie de planta que consumam.

Portugal (2001) sugeriu, para o caso de *Mechanitis polymnia*, que esta estratégia representa uma dupla vantagem adaptativa para as lagartas. A primeira é a proteção contra predação, e a segunda é que, escondendo-se quimicamente, as larvas não precisam alterar seu comportamento de forrageamento. Para *P. flavescens* ambas as vantagens também beneficiam as larvas.

Finalmente, é interessante notar a diversidade de estratégias de defesas químicas apresentadas por larvas. Mesmo defendendo-se através de substâncias, cada uma das espécies estudadas apresentou uma estratégia diferente não só em relação à composição, como também em relação ao seu modo de liberação e predador alvo. Além disso, considerando-se que em uma seqüência completa de predação, uma presa deve ser detectada, atacada, capturada, subjugada e consumida pelo predador (Chai 1990), ambas as larvas ainda se diferem por interromperem o processo de predação em estágios diferentes. Enquanto que compostos químicos defensivos de larvas de *P. flavescens* interrompem a predação ainda na detecção da presa, para *S. areolata* os compostos só se mostraram eficientes no penúltimo estágio da seqüência mencionada. Desta forma, seria importante investigar futuramente a origem dos compostos utilizados pelos besouros e tentar relacionar os compostos químicos empregados e os inimigos naturais alvo.

Tabela 2.1 Resultados da análise em CG-EM de hidrocarbonetos cuticulares de folhas de *Aureliana fasciculata* e de larvas de quinto ínstar de *Plagiometriona flavescens*.

Substância	IR	M ⁺	Folhas	Larvas
C ₂₁ H ₄₄	2100	296		0,97
C ₂₂ H ₄₆	2200	310		1,20
C ₂₃ H ₄₈	2300	324		1,76
C ₂₄ H ₅₀	2400	338		4,49
C ₂₅ H ₅₂	2500	352	0,60	5,90
C ₂₆ H ₅₄	2600	366		9,67
C ₂₇ H ₅₆	2700	380	4,83	13,78
C ₂₈ H ₅₈	2800	394	2,40	12,06
Esqualeno	2837	410	0,80	5,70
AR NI ^a 1	2867	?	0,74	
C ₂₉ H ₆₀	2900	408	9,14	15,19
C ₃₀ H ₆₂	3000	422	3,11	10,12
AR NI ^a 2	3054	?	32,67	3,97
C ₃₁ H ₆₄	3100	436	16,85	7,94
AR NI ^a 3	3158	?	4,24	
C ₃₂ H ₆₆	3200	448	3,93	3,50
AR NI ^a 4	3225	?	1,20	
AR NI ^a 5	3238	?	6,13	1,98
AR NI ^a 6	3270	?	10,16	1,75
AR NI ^a 7	3337	?	3,17	

^a Alcano ramificado não identificado.

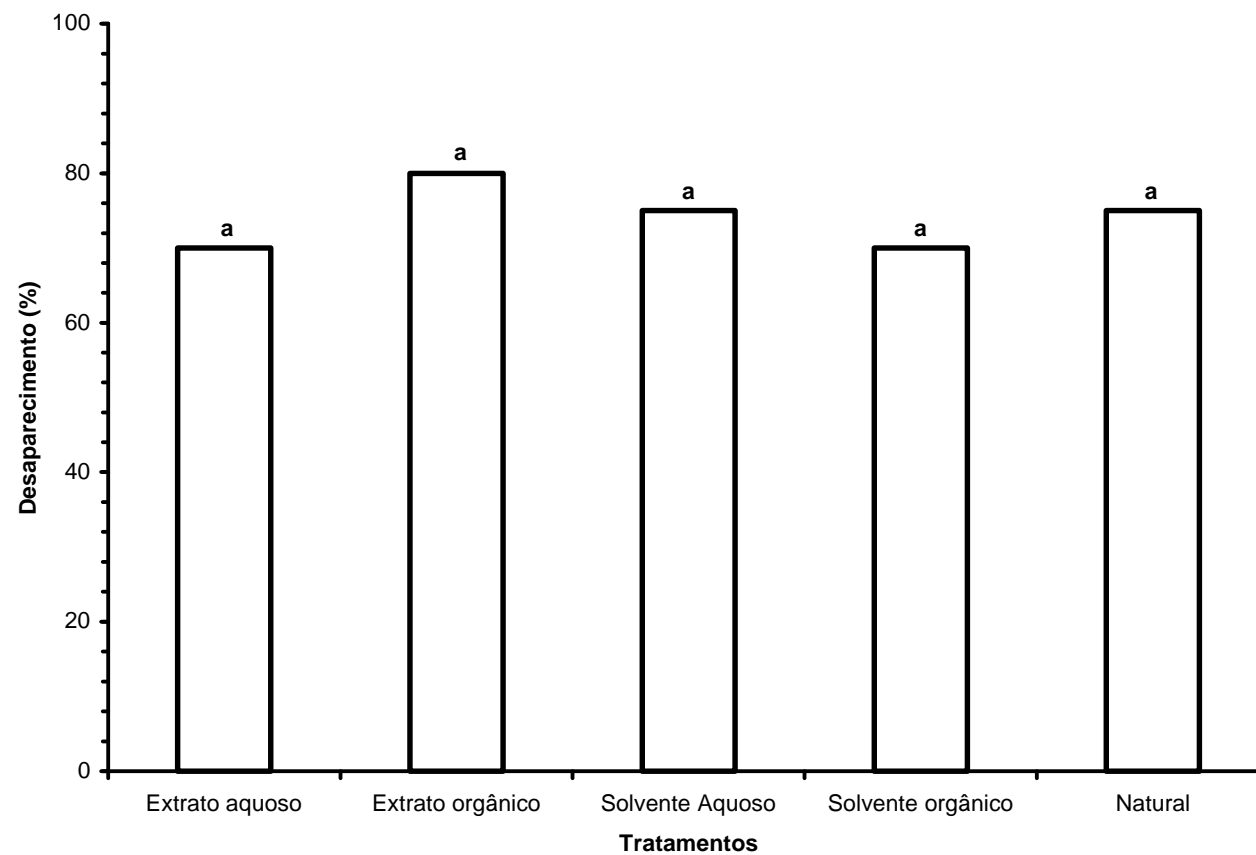


Figura 2.1. Desaparecimento de larvas de *Spodoptera frugiperda* usadas como isca para aplicação de extratos de larvas de *Stolas areolata* e seus controles. Iscas foram submetidas a um experimento de campo para testar a proteção química de larvas de *Stolas areolata* devido a substâncias químicas presentes no seu corpo. Tamanho amostral para todos os tratamentos = 20. Letras diferentes indicam diferença no nível de 5%.

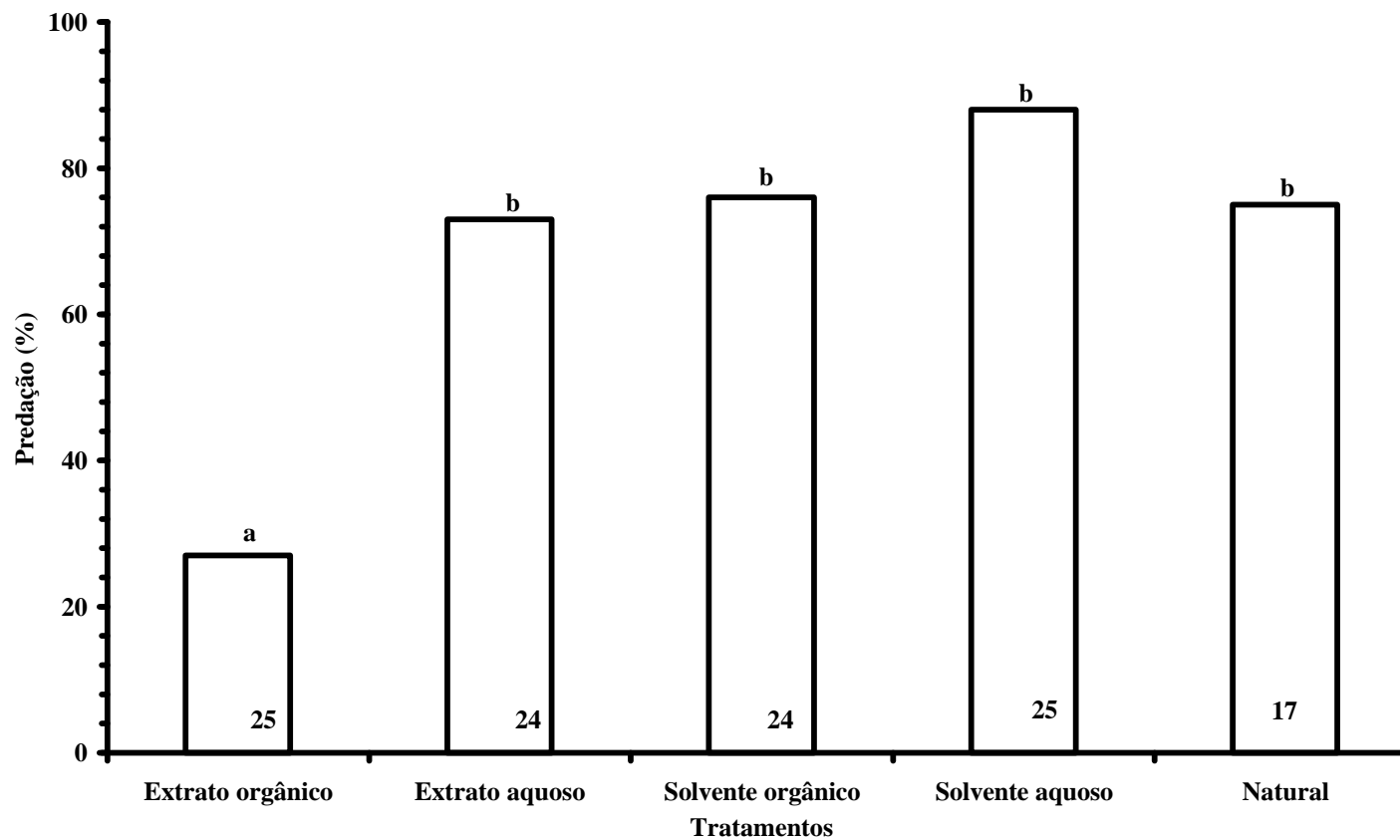


Figura 2.2. Taxas de consumo de larvas de *Spodoptera frugiperda* por *Gallus gallus* em um bioensaio no laboratório. Essas larvas foram usadas como vetores de compostos químicos encontrados no corpo de larvas de *S. areolata* e apresentados na forma de extratos orgânico e aquoso da larva do besouro.

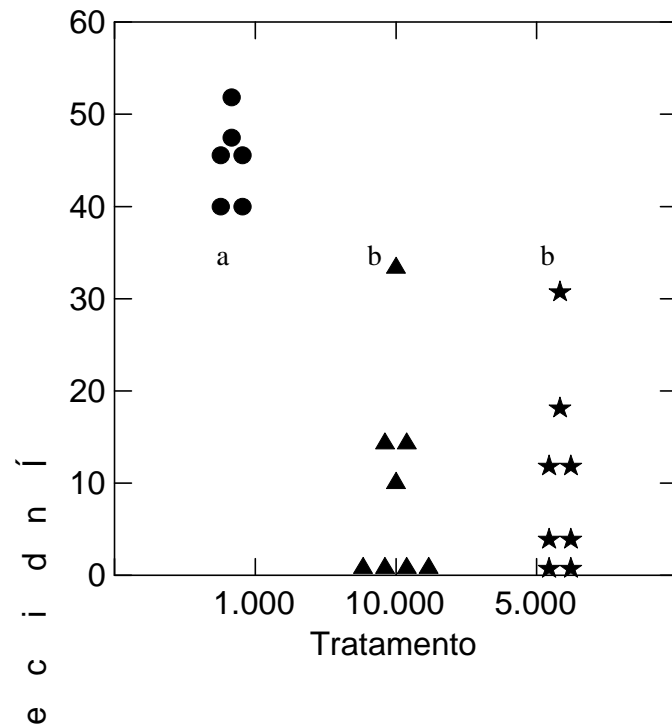


Figura 2.3. Índices de recrutamento da formiga *Camponotus crassus* em larvas de *Spodoptera frugiperda* pintadas com extratos de hidrocarbonetos cuticulares de folhas de *Aureliana fasciculata*. Tratamentos: 1 - controle, 10 - hidrocarbonetos dez vezes concentrados e 5- hidrocarbonetos cinco vezes concentrados. Letras diferentes indicam diferença no nível de 5% .

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste trabalho sugerem que experimentos de longa duração devem ser considerados quando se quer avaliar o efeito de uma determinada estrutura na sobrevivência do organismo. No caso dos escudos de fezes, como estes estão presentes sobre o corpo da larva durante todo o seu desenvolvimento, é importante que as investigações sobre esta estrutura sejam realizadas durante todo este período. Larvas podem ser mais susceptíveis à ação de inimigos naturais ou doenças provenientes do escudo em qualquer um dos diferentes instares de desenvolvimento. Como na maioria dos casos não se conhecem os principais inimigos naturais dos organismos e em que época são mais influentes ou se existe um outro fator de mortalidade importante a ser considerado, torna-se importante que seja avaliada a sobrevivência da larva durante todo o seu desenvolvimento. Além disso, não existem trabalhos que tenham tratado da proteção das larvas de nenhuma espécie de Chrysomelidae contra parasitóides, microorganismos, ou contra fatores abióticos. Portanto, a falta destas informações também reforça a importância de experimentos de longa duração.

De acordo com os resultados dos experimentos de longa duração apresentados nesta tese, o escudo de fezes de *P. flavescens* mostrou ser eficiente na proteção de larvas contra predadores. Esta estrutura também não apresenta nenhum custo para sua manutenção, refletido na sobrevivência e desempenho das larvas. Além disso, experimentos curtos em laboratório demonstraram que esta estrutura pode ser também potencialmente impalatável

Por outro lado, a manutenção do escudo de fezes em *S. areolata* parece ser custosa para larvas. Se considerássemos somente os resultados do experimento longo de campo,

seria possível sugerir que substâncias químicas presentes no escudo poderiam estar funcionando como cairomônios e atraindo predadores, como já havia sido demonstrado para outras espécies (Müller & Hilker 1999; Schaffner & Müller 2001). Entretanto, como estes mesmos resultados foram ainda mais marcantes no experimento longo de laboratório, na ausência de predadores, pode-se concluir que o próprio escudo seja o causador da mortalidade de *S. areolata* por razões desconhecidas, não relacionadas com predação. Uma das explicações prováveis para a manutenção dos escudos, apesar dos efeitos adversos amostrados, seria que esta estrutura poderia atuar na proteção contra fatores abióticos. Isto ainda precisa ser testado.

Em resumo, apesar dos escudos terem sido demonstrado em diversos trabalhos como uma estrutura de função de defesa contra predadores, estes podem influenciar a sobrevivência das larvas de duas maneiras: **1.** eficientes em proteger larvas contra ataques dos predadores, **2.** influenciar negativamente, ainda que de forma desconhecida, a sobrevivência das larvas. .

Hsiao & Windsor (1999) apresentaram filogenias preliminares de Hispinae (que inclui Cassidinae), mostrando que espécies mais primitivas utilizam Monocotiledôneas ou plantas que não apresentam caracteristicamente defesas químicas e as mais derivadas Dicotiledôneas (Asteraceae, Boraginaceae, Convolvulaceae e Solanaceae) que caracteristicamente contém compostos químicos considerados impalatáveis ou tóxicos. Além disso, esses autores mostraram que espécies de grupos mais derivados não apresentaram escudos ou estes eram formados somente por exúvias. Este fato pode indicar que em algumas espécies a presença do escudo representa um custo e portanto a habilidade de juntar fezes ou qualquer tipo de escudo deve ter sido perdida, sugerindo a evolução de

uma estratégia defensiva alternativa (p.e. seqüestro de substâncias químicas da planta hospedeira) para a proteção contra inimigos naturais ou fatores abióticos.

Edmunds (1974) e Begon *et al.* (1990) mencionaram que presas desenvolvem mecanismos de defesa e predadores desenvolvem mecanismos para ultrapassar essas defesas. Como a adaptação de predadores às defesas de suas presas não é incomum e cada espécie de presa pode ser consumida por diferentes espécies de predadores, com diferentes métodos de ataque. Isto leva a que diferentes animais apresentem diversos mecanismos de defesa. Os resultados que obtivemos nesta tese reforçam o fato que um determinado tipo de defesa não é suficiente contra todos os tipos de inimigos naturais que interagem com uma determinada espécie. A camuflagem química de *P. flavescens* e a presença de substâncias impalatáveis no corpo de *S. areolata* são exemplos de estratégias alternativas que larvas de Cassidinae podem apresentar.

Neste trabalho, investigamos diferentes estratégias de defesas químicas das duas espécies estudadas. Portanto ainda é possível que larvas apresentem outras estratégias não relacionadas à presença de compostos. *Plagiometriona flavescens* apresenta coloração críptica e *S. areolata* apresenta gregarismo, entre outras características não testadas na proteção contra inimigos naturais. É interessante notar que mesmo espécies tão próximas taxonomicamente podem apresentar estratégias diferentes contra predação. Não se sabe o quanto diferente pode ser a riqueza de inimigos naturais de *P. flavescens* em comparação com *S. areolata*. É possível que a utilização de estratégias de defesa reflita a pressão dos predadores mais freqüentes. A utilização de plantas hospedeiras diferentes, especialmente quimicamente, pode ser um fator que leve a diferenciação de estratégias de defesa de cada espécie e dos inimigos naturais de cada espécie. Ainda pode-se esperar que a

importância de cada estratégia deva variar, uma vez que em localidades diferentes a pressão por tipos diferentes de predadores também varia. De qualquer forma, é certo que ambas as espécies utilizam estratégias distintas contra predadores e o conhecimento sobre os fatores que levam a essa variação seria um passo importante no entendimento da ecologia entre insetos herbívoros e seus inimigos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akino, T.; J.J. Knapp & G.W. Elmes 1999. Chemical mimicry and host specificity in the butterfly *Maculinea rebeli*, a social parasite of *Myrmica* ant colonies. Proc. R. Soc. London B 266: 1419-1426.
- Attygalle, A.B.; D.J. Aneshansley; J. Meinwald & T. Eisner 2000. Defense by foot adhesion in a chrysomelid beetle (*Hemisphaerota cyanea*): characterization of the adhesive oil. Zoology 103: 1-6.
- Balsbaugh Jr., E.U. 1988. Mimicry and the Chrysomelidae. In Jolivet, P; Petitpierre, E. & Hsiao, T. (eds.). Biology of Chrysomelidae. Kluwer academic Publishers, Dodrecht, Holanda. Pp. 261-284.
- Begon, M.; J.L. Harper & C.R. Townsend 1990. Ecology: individuals, populations, and communities. Blackwell Science, Tauton, 945 pp.
- Begossi, A. 1984. Hábitos alimentares e coloração de advertência em alguns alticíneos (Coleoptera: Chrysomelidae). Dissertação de mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Begossi, A. & W.W. Benson 1988. Host plants and defense mechanisms in Oedionychina (Alticinae). In Jolivet, P; Petitpierre, E. & Hsiao, T. (Eds.). Biology of Chrysomelidae. Kluwer academic Publishers, Dodrecht, Holanda, pp. 57-71.
- Blum, M.S. 1994. Antipredator devices in larvae of the Chrysomelidae: a unified synthesis for defensive eclecticism. In P.H.Jolivet, M.L. Cox & E. Petitpierre (Eds.), Novel Aspects of the biology of Chrysomelidae. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, pp. 277-288.

- Borowiec, L. & J. Swietojanska 2003. Cassidinae of the world – an interactive manual (Coleoptera:Chrysomelidae).www.biol.uni.wroc.pl/cassidae/katalog%20internetowy/index.htm.
- Bowers, M.D. 1980. Unpalatability as a defense strategy of *Euphydryas phaeton* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolution* 34: 586-600.
- Bowers, M.D. 1992. The evolution of unpalatability and the cost of chemical defense in insects. *In*: Roitberg, B.D & M.B. Isman (eds.). *Insect chemical ecology. An evolutionary approach*. Chapman & Hall, Nova Iorque, pp. 216-244.
- Brower, J.V.Z. 1957. Experimental studies of mimicry in some north American butterflies. Part I. *Danaus plexippus* and *Limenitis archippus archippus*. *Evolution* 12: 32-47.
- Brown Jr., K.S. 1987. Chemistry at Solanaceae/Ithomiinae interface. *Ann. Missouri Botan. Garden* 74: 359-397.
- Buzzi, J.Z. 1988. Biology of Neotropical Cassidinae. *In*: Jolivet, P; E. Petitpierre & Hsiao, T. (eds.). *Biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, pp. 559-580.
- Buzzi, J.Z. 1994. Host plants of Neotropical Casidinae. *In* Jolivet, P.H; M.L. Cox & E. Petitpierre (Eds.). *Novel Aspects of the Biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, pp.204-212.
- Chaboo, C.S. 2002. First report of immatures, genitalia and maternal care in *Eugenysa columbiana* (Boheman) Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae: Eugenysini). *The Coleopterists Bulletin* 56: 5-67.

- Chai, P., 1990. Relationships between visual characteristics of rainforest butterflies and responses of a specialized insectivorous bird. *In*: M. Wicksten (compiler), Adaptive coloration in invertebrates. College Station, Texas, pp. 31-60.
- Chattopadhyay, A.K. & N.C. Sukul 1994. Anti-predator strategy of larval aggregation pattern in *Aspidomorpha miliaris* (Chrysomelidae: Coleoptera). *Entomon* 19: 125-130.
- Damman, H. & N. Cappuccino 1991. Two forms of defence in a chrysomelid beetle: egg clumping and excrement cover. *Ecol. Entomol.* 16: 163-167.
- Del-Claro, K. 1991. Notes on mimicry between two tropical beetle in south-eastern Brazil. *J. Trop. Ecol.* 7: 407-410.
- Dettner, K. & C. Liepert 1994. Chemical mimicry and camouflage. *Ann. Rev. of Entomol.* 39: 129-54.
- Dicke, M. & M.W. Sabelis 1992. Costs and benefits of chemical information conveyance: proximate and ultimate factors. *In*: Roitberg, B.D & M.B. Isman (eds.). *Insect chemical ecology. An evolutionary approach.* Chapman & Hall, Nova Iorque, pp. 122-155.
- Dobler, S.; P. Mardulyn; J.M. Pasteels & M. Rowell-Rahier 1996. Host-plant switches and the evolution of chemical defense and life history in the leaf beetle genus *Oreina*. *Evolution* 50: 2373-2386.
- Dubis, E.; E. Malinski, A. Dubis; J. Szafranek; J. Nawrot; J. Poplawski & J.T. Wróbel 1987. Sex-dependent composition of cuticular hydrocarbons of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Comp. Biochem. Physiol.* 87A: 839-843.

- Dyer, L.A. & M.D. Bowers 1996. The importance of sequestered iridoid glycosides as a defense against an ant predator. *J. Chem. Ecol.* 22: 1527-1539.
- Edmunds, M. 1974. *Defence in animals: a survey of antipredator defenses*. Longman Group Limited, Harlow, 357 pp.
- Eisner, T. & M. Eisner, 2000. Defensive use of a fecal thatch by a beetle larva (*Hemisphaerota cyanea*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 2632-2636.
- Eisner, T.; E. Tassel & J.E. Carrel 1967. Defensive use of "Fecal shield" by a beetle larva. *Science* 158: 1471-1473.
- Elmes, G.W.; J.C. Wardlaw & J.A. Thomas 1991. Larvae of *Maculinea rebeli*, a large-blue butterfly, and their *Myrmica* host ants: patterns of caterpillar growth and survival. *J. Zool.* 224: 79-92.
- Elmes, G.W.; T. Akino; J.A. Thomas & R.T. Clarke 2002. Interspecific differences in cuticular hydrocarbon profiles of *Myrmica* ants are sufficiently consistent to explain host specificity by *Maculinea* (large blue) butterflies. *Oecologia* 130: 525-535.
- Endler, J. A. 1981. An overview of the relationships between mimicry and crypsis. *Biol. J. Lin. Soc.* 16: 23-31.
- Erlich, P.R. & D.D. Murphy 1988. Plant chemistry and host range in insect herbivores. *Ecology* 69: 908-909.
- Espelie, K. E.; E.A. Bernays & J.J. Brown 1991. Plant and insect cuticular lipids serve as behavioral cues for insects. *Arch. of Insect Biochem. Physiol.* 17: 223-233.
- Evans P.H.; J.X. Becerra, D.L. Venable & W.S. Bowers 2000. Chemical analysis of squirt-gun defense in *Bursera* and counterdefense by chrysomelid beetles. *J. Chem. Ecol.* 26: 745-754.

- Evans, D.L. & G.P. Waldbauer 1982. Behavior of adult and naive birds when presented with a bumblebee and its mimic. *Z. Tierpsychol.* 59: 247-259.
- Ferraz, J.M.G. 1991. Estudos bioecológicos sobre *Spodoptera frugiperda* (Abbot e Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) como subsídio ao manejo integrado de pragas na cultura do milho. Tese de doutorado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Flowers, R.W. 1991. Aggregations of Cassidinae (Chrysomelidae) in Santa Rosa and Guanacaste National Parks, Costa Rica. *Biotropica* 23: 308-310.
- Friero-Costa, F.A. & J. Vasconcellos-Neto 2003. Biological and ecological studies on *Omaspides tricolorata* Boheman 1854 (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). In D.G. Furth (ed.). *Special topics in leaf beetle biology. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Chrysomelidae.* Pensoft Publishers, Sofia. Pp. 213-226.
- Furth, D.G. 1988. The jumping apparatus of flea beetles (Alticinae) – the metafemoral spring. In Jolivet, P; Petitpierre, E. & Hsiao, T. (eds.). *Biology of Chrysomelidae.* Kluwer academic Publishers, Dodrecht, Holanda. Pp. 233-252.
- Futuyma, D.J. 1993. *Biologia Evolutiva.* 2ª edição. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto.
- Futuyma, D.J.; M.C. Keese & S.J. Scheffer 1993. Genetic constraints and the phylogeny of insect-plant associations: responses of *Ophraella communa* (Coleoptera: Chrysomelidae) to host plants of its congeners. *Evolution* 47: 888-905.

- Golden, K.L.; L.J. Meike & D.W. Stanley-Samuelson 1992. Cuticular hydrocarbon discrimination of *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) sibling species. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 85(5): 561-570.
- Gómez, N.E.; L. Witte & T. Hartmann 1999. Chemical defense in larval tortoise beetles: essential oil composition of fecal shields of *Eurypedus nigrosignata* and foliage of its host plant, *Cordia curassavica*. *J. Chem. Ecol.* 25: 1007-1027.
- Gould, S.J. & R.C. Lewontin 1979. The spandrels of San Marco and the. *Proc. Royal Soc. London. Series B* 205: 581-598.
- Grégoire, J.C. 1988. Larval gregariousness in the Chrysomelidae. *In: Jolivet, P; E. Petitpierre & T.Hsiao (eds.). Biology of Chrysomelidae.* Kluwer academic Publishers, Dodrecht, pp. 253-260.
- Guilford, T. 1990. The evolution of aposematism. *In: Evans, D.L. & J.O. Schmidt (eds.) Insect defenses.* State University of New York Press, Albany, pp. 23-62.
- Haverty, M.I.; B.L. Thorne & L.J. Nelson 1996. Hydrocarbons of *Nasutitermes acajutlae* and comparison of methodologies for sampling cuticular hydrocarbons of caribbean termites for taxonomic and ecological studies. *J. Chem. Ecol.* 22: 2081-2110.
- Hemptinne, J.L.; G. Lognay & A.F.G. Dixon 1998. Mate recognition in the two-spot ladybird beetle, *Adalia bipunctata*: role of chemical and behavioural cues. *J. Insect Physiol.* 44: 1163-1171.
- Heron, H.D.C. 1999. The biology of *Conchyloctenia punctata* (Fabricius) – a cycloalexid cassid (Chrysomelidae: Cassidinae). *In: M.L. Cox (ed.). Advances in Chrysomelidae Biology 1.* Backhuys Publishers, Leiden, pp. 565-580.

- Hilker, M. 1989. Intra- and interspecific effects of larval secretions in some chrysomelids (Coleoptera). *Entomol. Exp. Appl.* 53: 237-245.
- Hilker, M. 1992. Protective devices of early developmental stages in *Pyrrhalta viburni* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Oecologia* 92: 71-75.
- Hilker, M. 1994. Egg deposition and protection of eggs in Chrysomelidae. *In: Jolivet P.H.; M.L. Cox & E. Petitpierre (eds.), Novel Aspects of the biology of Chrysomelidae.* Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, pp. 263-276.
- Hilker, M. & A. Köpf 1994. Evaluation of the palatability of chrysomelid larvae containing anthraquinones to birds. *Oecologia* 100: 421-429.
- Hölldobler, B. & E.O. Wilson 1990. *The ants.* The Belknap Press, Cambridge, 732 pp.
- Hough-Goldstein, J.A., J. Geiger, D. Chang & W. Saylor, 1993. Palatability and toxicity of the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to domestic chickens. *Ann. Entomol. Soc. America* 86: 158-164.
- Howard, R.W.; R.D. Akre & W.B. Garnett 1990. Chemical mimicry in an obligate predator of carpenter ants (Hymenoptera: Formicidae). *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 83(3): 607-616.
- Hsiao, T. H. ,1986. Specificity of certain Chrysomelidae beetles for Solanaceae. *In: D'Arcy, W. G (ed.). Biology and Systematics of Solanaceae.* Columbia University Press, Nova Iorque, pp. 345-377.
- Hsiao, T.H. & D.M. Windsor 1999. Historical and biological relationships among Hispinae inferred from 12S MTDNA sequence data. *In: Cox, M.L. (ed.). Advances in Chrysomelidae Biology 1.* Backhuys Publishers, Leiden, pp.39-50.

- Jacob, J. & H. P. Hanssen 1986. Distribution and variability of cuticular hydrocarbons within the Coleoptera. *Biochem. Sys. Ecol.* 54: 207-210.
- Jolivet, P. 1988. Food habits and food selection of Chrysomelidae. Bionomic and evolutionary perspectives. In P.Jolivet, E. Petitpierre & T.H. Hsiao (Eds.), *Biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, Holanda. Pp. 331-336.
- Jolivet, P. 1994. Physiological colour changes in tortoise beetles. In P.H.Jolivet, M.L. Cox & E. Petitpierre (Eds.), *Novel Aspects of the biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, Holanda. Pp. 331-336.
- Jolivet, P. & K.K. Verma 2002. *Biology of leaf beetles*. Intercept Limited, Andover, 331 pp.
- Kearsley, M.J.C. & T.G. Whitham 1992. Guns and butter: a no cost defense against predation for *Chrysomela confluens*. *Oecologia* 92: 556-562.
- Köpf, A.; N.E. Rank; H. Roininen & J. Tahvanainen 1997. Defensive larval secretions of leaf beetles attract a specialist predator *Parasyrphus nigratarsis*. *Ecol. Entomol.* 22: 176-183.
- Köpf, A.; N.E. Rank; H. Roininen; R.Julkunen-Tiitto; J.M. Pasteels & J. Tahvanainen 1998. The evolution of host-plant use and sequestration in the leaf beetle genus *Phratora* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Evolution* 52: 517-528.
- Krebs, C.J. 1998. *Ecological methodology*. 2^a ed. Addison Wesley Longman, 620 pp.
- Kudo, S.C. & E. Ishibashi 1995. Notes on maternal care in the ovoviviparous leaf beetle *Gonioctena japonica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *The Canadian Entomologist* 127: 275-276.

- Leitão-Filho, H.F. 1992 A flora arbórea da Serra do Japi. In Morellato, L.P.C (org.), História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil. Editora da Unicamp. Pp. 40-62.
- Lockey, K. H. 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 89B: 595-645.
- Maynard-Smith J.; 1985. Developmental constraints and evolution. *Quart. Rev. Biol.* 60: 265-287.
- Meer, R.K.V. & D.P. Wojcik 1982. Chemical mimicry in the myrmecophilous beetles *Myrmecaphodius escavaticollis*. *Science* 218: 806-808.
- Miller, J.S. & P. Feeny 1983. Effects of benzyloquinoline alkaloids on the larvae of polyphagous Lepidoptera. *Oecologia* 58: 332-339.
- Morton, T. C. & F. V. Vencl, 1998. Larval beetles form a defense from recycled host plant chemicals discharged as fecal wastes. *J. Chem. Ecol.* 24: 765-785.
- Muller, C., 2002. Variation in the effectiveness of abdominal shields of cassidine larvae against predators. *Entomol. Exp. et Appl.* 102: 191-198.
- Müller, C. & M. Hilker, 1999. Unexpected reactions of a generalist predator towards defensive devices of cassidine larvae (Coleoptera, Chrysomelidae). *Oecologia* 118: 166-172.
- Müller, C. & M. Hilker, 2003. Advantages and disadvantages of abdominal shields of chrysomelid larvae: Mini-review. In P.H. Jolivet & Furth, D.G. (eds.). Special topics in leaf beetle biology. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Chrysomelidae. Pensoft Publishers, Sofia, pp. 243-260.

- Nogueira-de-Sá, F. 1999. Influência da interação com plantas hospedeiras (Asteraceae) e inimigos naturais na abundância de três espécies de Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae) na Serra do Japi, SP. Dissertação de mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, SP.
- Nogueira-de-Sá, F. & Macedo, M.V. 1998. Host plant preference of *Plagiometriona flavescens* (Coleoptera: Chrysomelidae) for two solanaceous species. *In*: Biondi, M., M. Daccordi & , D.G. Furth (eds.) Proceedings of the Fourth International Symposium on the Chrysomelidae. Mus. Reg. Nat., Turim, pp. 287-297.
- Nogueira-de-Sá, F. & M.V. Macêdo 1999. Behavior and population fluctuation of *Plagiometriona flavescens* (Boheman) (Chrysomelidae: Cassidinae). *In*: Cox, M.L. (ed.). Advances in Chrysomelidae Biology 1. Backhuys Publishers, Leiden, pp. 299-305.
- Nogueira-de-Sá, F. & J. Vasconcellos-Neto 2003a. Natural enemies of Neotropical cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae) and their phenology. *In*: Jolivet, P. & D.G. Furth (eds.). Special topics in leaf beetle biology. Proceedings of the Fifth International Symposium on the Chrysomelidae. Pensoft Publishers, Sofia, pp. 161-174.
- Nogueira-de-Sá, F. & J. Vasconcellos-Neto 2003b. Host plant utilization and population abundance of three tropical species of Cassidinae (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Nat. History* 37: 681-696.
- Nogueira-de-Sá, F.; Medeiros, L. & Macedo, M.V. No prelo. Phenology of populations of tortoise beetles (Cassidine) in Brazil. *In* P. Jolivet ; Santiago-Blay, J.A. & Schmitt,

- M. (Eds.). New developments on the Biology of Chrysomelidae. SPB academic Publishing bv, The Hague.
- Olmstead, K. 1994. Waste products as chrysomelid defenses. *In*: Jolivet, P. H.; M. L. Cox & E. Petitpierre (eds.). Novel Aspects of the Biology of Chrysomelidae. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 311-318
- Olmstead, K. 1996. Cassidine defense and natural enemies. *In*: P. H. Jolivet & M. L. Cox (eds.). Chrysomelidae Biology, vol. 2: Ecological Studies. SPB Academic Publishing, Amsterdam, pp. 3-21.
- Olmstead, K. & R.F. Denno 1992. Cost of shield defense in tortoise beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ecol. Entomol.* 17: 237-243.
- Olmstead, K. & R.F. Denno 1993. Effectiveness of tortoise beetle larval shields against different predator species. *Ecology* 74: 1394-1405.
- Palokangas, P. & S. Neuvonen 1992. Differences between species and instars of *Phratora* leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae) in the probability of being preyed on. *Ann. Zool. Fennici* 29: 273-278.
- Pasteels, J.M.; M. Rowell-Rahier; J.C. Braekman & D. Dalozé 1984. Chemical defenses in leaf beetles and their larvae: the ecological, evolutionary and taxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.* 12: 395-406.
- Pasteels, J.; J.C. Braekman, & D. Dalozé 1988a. Chemical defense in the Chrysomelidae. *In* Jolivet, P; E. Petitpierre & T. Hsiao (eds.). Biology of Chrysomelidae. Kluwer academic Publishers, Dodrecht, pp. 233-252.

- Pasteels, J. M Rowell-Rahier & M.J. Raupp 1988b. Plant-derived defense in Chrysomelid beetles. *In* Barbosa, P. & D. Letourneau (eds.). *Novel Aspects of Insect-Plant interactions*. Wiley, Nova Iorque. Pp. 235-272.
- Pasteels, J.M. & M.Rowell-Rahier 1991. Proximate and ultimate causes for host plant influence on chemical defense of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Entomol. Gener.* 15: 227-235.
- Pasteels, J.M.; M. Rowell-Rahier; J.C. Braeckman & D. Daloze 1994. Chemical defense of adult leaf beetle updated. *In* P.H.Jolivet, M.L. Cox & E. Petitpierre (eds.), *Novel Aspects of the biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, pp. 289-302.
- Pasteels, J.M.; S. Dobler; M. Rowell-Rahier; A. Ehmke & T. Hartmann 1995. Distribution of autogenous and host-derived chemical defenses in *Oreina* leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Chem. Ecol.* 21: 1163-1179.
- Pasteels, J.M.; M. Rowell-Rahier; A. Ehmke & T. Hartmann 1996. Host-derived pyrrolizidine alkaloids in *Oreina* leaf beetles: physiological, ecological and evolutionary aspects. *In*: Jolivet, P.H.A. & M.L. Cox (eds.). *Chrysomelidae Biology*, vol. 2: Ecological Studies. SPB Academic Publishing, Amsterdam.
- Pasteels, J.M.; C. Theuring; L. Witte, T. Hartmann 2003. Sequestration and metabolism of protoxic pyrrolizidine alkaloids by larvae of the leaf beetle *Platyphora boucardi* and their transfer via pupae into defensive secretions of adults. *J. Chem. Ecol.* 29: 337-355.

- Pinto, H.S. 1992. Clima na Serra do Japi. . In Morellato, L.P.C (org.), História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil. Editora da Unicamp. Pp. 30-38.
- Portugal, A.H.A. 2001. Defesa química em larvas da borboleta *Mechanitis polymnia* (Nymphalidae: Ithomiinae). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, SP.
- Raupp, M.J.; F.R. Milan; P. Barbosa & B. Leonhardt 1986. Methylcyclopentanoid monoterpenes mediate interactions among insect herbivores. Science 232: 1408-1410
- Ridley, M. 1996. Evolution. 2ª edição. Blackwell Science, Inc. Massachusetts.
- Root, R.B. & F.J. Messina 1983. Defensive adaptations and natural enemies of a case bearing beetle, *Exema canadensis* (Coleoptera: Chrysomelidae). Psyche 90: 67-80.
- Rowell-Rahier, M. & J.M. Pasteels 1992. Third trophic level influences of plant allelochemicals. In: Rosenthal, G.A. & M.R. Berenbaum (eds.). Herbivores- their interactions with secondary plant metabolites. Volume II: Evolutionary and Ecological processes. Academic press Inc., pp. 243-277.
- Rowell-Rahier, M.; J.M. Pasteels; A. Alonso-Mejia & L.P. Brower 1995. Relative unpalatability of leaf beetles with either biosynthesized or sequestered chemical defence. Anim. Behav. 49: 709-714.
- Schaffner, U & C. Müller 2001. Exploitation of the fecal shield of the lily leaf beetle, *Lilioceris lilli* (Coleoptera: Chrysomelidae), by the specialist parasitoid *Lemophagus pulcher* (Hymenoptera: Ichneumonidae). J. Insect Behavior 14: 739-757.

- Schindek, R. & M. Hilker 1996. Influence of larvae of *Gastrophysa viridula* on the distribution of conspecific adults in the field. *Ecol. Entomol.* 21: 370-376.
- Schlee, M.A. 1986. Avian predation on Heteroptera: experiments on the European blackbird *Turdus m. merula* L. *Ethology* 73: 1-18.
- Schmitt, M. 1994. Stridulation in leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). . In P.H.Jolivet, M.L. Cox & E. Petitpierre (Eds.), *Novel Aspects of the biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, Holanda. Pp. 319-325.
- Schoonhoven, L.M.; T. Jermy & J.J. van Loon 1998. *Insect-plant biology. From physiology to evolution*. Chapman & Hall, Londres. 409 pp.
- Schuler, W. & E. Hesse 1985. On the function of warning coloration: a black and yellow pattern inhibits prey-attack by naive domestic chicks. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 16: 249-255.
- Schultz, J.C. 1988. Many factors influence the evolution of herbivore diets, but plant chemistry is central. *Ecology* 69: 896-897.
- Seifert, R.P. & F.H. Seifert 1979. Utilization of Heliconia (Musaceae) by the beetle *Xenarescus monocerus* (Oliver) (Chrysomelidae: Hispinae) in a Venezuelan forest. *Biotropica* 11: 51-59.
- Silva, K.L. 2000. Alcalóides pirrolizidínicos utilizados por insetos na defesa química contra predadores vertebrados e invertebrados. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Singer, T. L. 1998. Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *Amer. Zool.* 38: 394-405.

- Strong, D.R.; J.H. Lawton & R. Southwood 1984. Insects on plants. Community patterns and mechanisms. Harvard University Press, Cambridge. 313 pp.
- Termonia, A.; T.H. Hsiao; J.M. Pasteels & M.C. Milinkovitch 2001. Feeding specialization and host-derived chemical defense in Chrysomeline leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98: 3909-3914.
- van den Dool, H. & P.D. Kratz 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J. Chromatogr. 11: 463-471.
- Vasconcellos-Neto, J. & P. Jolivet 1994. Cycloalexy among chrysomelid larvae. *In*: P.H.Jolivet, M.L. Cox & E. Petitpierre (eds.). Novel Aspects of the biology of Chrysomelidae. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, pp. 303-310.
- Vasconcellos-Neto, J. 1988. Genetics of *Chelymorpha cribraria*, Cassidinae: colour patterns and their ecological meanings. *In*: Jolivet, P; E. Petitpierre & T. Hsiao (eds.). Biology of Chrysomelidae. Kluwer academic Publishers, Dodrecht, pp. 217-232.
- Vencl, F. & T.C. Morton 1998. The shield defense of sumac flea beetle, *Blepharida rhois* (Chrysomelidae: Alticinae). Chemoecology 8: 25-32.
- Vencl, F. & T. C. Morton 1999. Macroevolutionary aspects of larval shield defences. *In*: M.L. Cox (ed.). Advances in Chrysomelidae Biology 1. Backhuys Publishers, Leiden.
- Vencl, F.; T.C.Morton; R.O. Mumma & J.C. Schultz 1999. Shield defense of a larval tortoise beetle. J. Chem. Ecol. 25: 549-566.

- Wiklund, C. & T. Järvi 1982. Survival of distasteful insects after being attacked by naive birds: a reappraisal of the theory of aposematic coloration evolving through individual selection. *Evolution* 36: 998-1002.
- Wiklund, C. & B. Sillén-Tullberg 1985. Why distasteful butterflies have aposematic larvae and adults, but cryptic pupae: evidence from predation experiments on the monarch and the european swallowtail. *Evolution* 39: 1155-1158.
- Windsor, D.M. 1987. Natural history of a subsocial tortoise beetle, *Acromis sparsa* Boheman (Chrysomelidae, Cassidinae) in Panama. *Psyche* 94: 127-150.
- Windsor, D.; E.Riley & H. Stockwell 1992. An introduction to the biology and systematics of Panamanian tortoise beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae). *In*: Quintero, D. & A.Aiello (eds.). *Insects of Panama and Mesoamerica selected studies*. Oxford University Press, Oxford, pp. 372-391.
- Windsor, D.M. & J.C. Choe 1994. Origins of parental care in chrysomelid beetles. *In* P.H.Jolivet, M.L. Cox & E. Petitpierre (Eds.), *Novel Aspects of the biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, Holanda. Pp. 111-117
- Wolda, H. 1981. Similarity indices, sample size and diversity. *Oecologia (Berl)* 50: 296-302.
- Young, H.P. & C. Schal 1997. Cuticular hydrocarbon synthesis in relation to feeding and developmental stage in nymphs of *Blattella germanica* (Dytyoptera: Blattellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90: 655-663.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, 663pp.